Cu/Zn SUPEROXIDDISMUTASE AUS MILZGEWEBE VON GESUNDEN RINDERN UND RINDERN MIT SEROLOGISCH NACHGEWIESENEM ANTIKÖRPER GEGEN DAS BOVINE LEUKÄMIE-VIRUS (BLV)

VERGLEICH ZU Cu/Zn SUPEROXIDDISMUTASE AUS HUMAN-ERYTHROCYTEN

GERHARD GROENEVELD

Diss
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544313_0002

Aus der Medizinischen Klinik III des
Klinikums Großhadern der
Universität München
Direktor Prof. Dr. W. Wilmanns

Cu/Zn Superoxiddismutase aus Milzgewebe von gesunden Rindern und Rindern mit serologisch nachgewiesenem Antikörper gegen das bovine Leukämie-Virus (BLV). Vergleich zu Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gerhard Groeneveld
aus München

Jahr
1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. W. Wilmanns

Mitberichterstatter:

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juli 1984

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

Die vorliegende Dissertation wurde im Forschungslabor der Medizinischen Klinik III des Klinikums Großhadern durchgeführt und durch Mittel der Curt-Bohnewand-Stiftung der Universität München (SOD-Projekt, Dr. Issels, 1980/81) sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Kennwort: Superoxiddismutase, Is 31/1-1, 1982/83) unterstützt.

Meinen Eltern

und meinem Kollegen

Siegfried Prenninger

in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Bildung von Sauerstoffradikalen	1
1.2.	Superoxiddismutasen: Vorkommen und Funktion	2
1.3.	Superoxidradikale in vivo und die biologische Bedeutung von Superoxiddismutasen	3
1.4.	Engere Problemstellung	4
2.	MATERIAL UND METHODEN	6
2.1.	Geräte	6
2.2.	Chemikalien und Reagenzien	8
2.3.	Methoden	10
2.3.1.	Allgemeine Methoden	10
2.3.1.1.	Proteinnachweis über direkte Absorptionsmessung bei 280 nm	10
2.3.1.2.	Proteinbestimmung nach Lowry	10
2.3.1.3.	Proteinbestimmung über molaren Absorptionskoeffizienten	14
2.3.1.4.	Hämoglobinbestimmung	14
2.3.1.5.	Konduktometrie	17
2.3.1.6.	Dialyse	17
2.3.1.7.	Ultrafiltraton	18
2.3.1.8.	Diafiltration	18
2.3.2.	Isolierung von Cu/Zn Superoxiddismutase	19
2.3.2.1.	Prinzip	19
2.3.2.2.	Trennungsgang	19
2.3.3.	Enzymaktivitätsbestimmung der Superoxiddismutase - Indirekte Methode	21
2.3.3.1.	Hemmung der Reduktion von Cytochrom c in Lösung	23
2.3.3.1.1.	Prinzip	23
2.3.3.1.2.	Lösungen für den Testansatz	24
2.3.3.1.3.	Testansatz	25

2.3.3.1.4.	Quantitative Auswertung	26
2.3.3.1.5.	Abhängigkeit der Aktivität der Cu/Zn Superoxiddismutase von Cyanid	29
2.3.3.2.	Hemmung der Nitritbildung aus Hydroxylammoniumchlorid in Lösung	31
2.3.3.2.1.	Prinzip	31
2.3.3.2.2.	Lösungen für den Testansatz	32
2.3.3.2.3.	Testansatz	33
2.3.3.2.4.	Quantitative Auswertung	34
2.3.3.2.5.	Abhängigkeit der Aktivität der Cu/Zn Superoxiddismutase von Cyanid	35
2.3.3.3.	Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau	37
2.3.3.3.1.	Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau nach isoelektrischer Fokussierung	37
2.3.3.3.1.1.	Durchführung	38
2.3.3.3.1.2.	Elektrophoresebedingungen für die isoelektrische Fokussierung	38
2.3.3.3.1.3.	Lösungen	39
2.3.3.3.2.	Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau nach Polyacrylamid Diskelektrophorese	39
2.3.3.3.2.1	Lösungen zur Herstellung der Gele	40
2.3.3.3.2.2	Gelherstellung	41
2.3.3.3.2.3	Probenvorbereitung	42
2.3.3.3.2.4	Durchführung der Elektrophorese	42
2.3.4	Enzymaktivitätsbestimmung der Superoxiddismutase - direkte Methode	43
2.3.4.1	Pulsradiolyse	43
2.3.5.	Spezielle analytische Methoden	45
2.3.5.1	Auftrennung der Proteine durch isoelektrische Fokussierung	45
2.3.5.2	Auftrennung der Proteine durch Polyacrylamid Diskgelelektrophorese	47

2.3.5.3	Auftrennung der Proteine durch zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese	47
2.3.5.3.1	Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamidgelen (1. Dimension)	47
2.3.5.3.1.1	Lösungen zur Herstellung der Gele	48
2.3.5.3.1.2	Gelansatz	49
2.3.5.3.1.3	Auftragen der Proben und Durchführung der Elektrophorese	49
2.3.5.3.2	Auftrennung der isoelektrisch fokussierten Proteine auf Polyacrylamid-Gradientengel (2. Dimension)	50
2.3.5.3.2.1	Lösungen für die Gradientengele	50
2.3.5.3.2.2	Lösungen für das Spacergel	51
2.3.5.3.2.3	Agaroselösung	51
2.3.5.3.2.4	Herstellung des Polyacrylamid-Gradientengels	52
2.3.5.3.2.5	Zusammensetzung der Eichproteine	52
2.3.5.3.2.6	Durchführung der Elektrophorese	53
2.3.5.3.2.7	Färbung der Gradientengele	54
2.3.5.3.3	Auswertung	55
2.3.5.4	Metallgehaltsbestimmung	56
2.3.5.4.1	Prinzip	56
2.3.5.4.2	Durchführung der Messungen	56
2.3.5.5	Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	60
2.3.5.5.1	Lösungen	60
2.3.5.5.2	Herstellung der Gele	61
2.3.5.5.3	Vorbereitung der Proben	62
2.3.5.5.4	Eichproteine	62
2.3.5.5.5	Probenansätze	63
2.3.5.5.6	Elektrophorese	63
2.3.5.5.7	Färbung der Gele	64
2.3.5.5.8	Auswertung	64

3.	E R G E B N I S S E	66
3.1	Isolierung der Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz und Milz mit serologisch nachgewiesenem Antikörper gegen das bovine Leukämie-Virus	66
3.1.1	Gewinnung des Ausgangsmaterials	66
3.1.2	Histologischer Befund	67
3.1.3	Gewebsaufarbeitung und Gewinnung von Rohhomogenat bzw. Homogenat-Überstand	68
3.1.4	Hämoglobinfällung nach der Tsuchihashi-Methode	69
3.1.5	Hämoglobinbestimmung	69
3.1.6	Salzfällung	70
3.1.7	Acetonfällung	71
3.1.8	Kationenaustauschchromatographie im diskontinuierlichen Verfahren (Batch-Verfahren)	72
3.1.9	Gelfiltrationschromatographie	77
3.1.10	Anionenaustauschchromatographie	82
3.1.11	Reinigungstabellen	87
3.1.12	Reinigungsgel (Übersicht)	90
3.2	Isolierung der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten	91
3.2.1	Hämolyse	92
3.2.2	Hämoglobinfällung nach der Tsuchihashi-Methode	93
3.2.3	Salzfällung	93
3.2.4	Acetonfällung	94
3.2.5	Kationenaustauschchromatographie im diskontinuierlichen Verfahren (Batch-Verfahren)	94
3.2.6	Dialyse	96
3.2.7	Gelfiltrationschromatographie	96
3.2.8	Anionenaustauschchromatographie	99
3.2.9	Entsalzung über Sephadex G-25	102
3.2.10	Reinigungstabelle	104

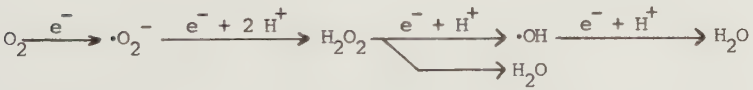
3.2.11	Reinigungsgel (Übersicht)	106
3.3	Analytische Untersuchungen an den gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Rindermilz-Gewebe und Human Erythrocyten	107
3.3.1	Auftrennung der Proteine durch Polyacrylamid Diskgelelektrophorese	107
3.3.2	Auftrennung der Proteine durch zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese	110
3.3.3	Molekulargewicht	115
3.3.4	Metallgehaltsanalyse	119
3.3.5	Pulsradiolyse	121
3.3.6	Immunologische Untersuchungen mit gereinigter Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten	123
3.3.7	Immunologische Untersuchungen mit gereinigter Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindergewebe	126
4.	D I S K U S S I O N	128
4.1	Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz und BLV-positiver Rindermilz	129
4.2	Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten	136
4.3	Zusammenfassung	138
5.	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	140

1. EINLEITUNG

Im Laufe der Evolution haben Grünalgen die Fähigkeit erworben, mittels Lichtenergie Wasser in freien Sauerstoff und organisch gebundenen Wasserstoff umzuwandeln (31, 87). Damit war die Evolution von photosynthetischen Prozessen abhängig, mit deren Hilfe elektromagnetische Lichtenergie in verwertbare chemische Energie umgewandelt wurde. Im Rahmen dieser Syntheseleistung wurde als Nebenprodukt molekularer Sauerstoff in die Biosphäre abgegeben, in dessen Gegenwart Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffverbindungen in CO_2, N_2 und H_2O umgewandelt wurden. Dadurch entstand ein starker Evolutionsdruck auf alle damals existierenden anaeroben Organismen zur Entwicklung von biochemischen Abwehrmechanismen, die den Tod des Organismus durch sich anhäufenden molekularen Sauerstoff und dessen toxische Folgeprodukte verhindern sollten.

1.1. Bildung von Sauerstoffradikalen

Um molekularen Sauerstoff vollständig unter Kontrolle zu bringen, ist dessen komplette Reduktion zu Wasser notwendig; dies geschieht in vier Schritten, bei denen auf jedes Sauerstoffmolekül (O_2) insgesamt vier Elektronen übertragen werden (29).



Bei dieser monovalenten, stufenweisen Reduktion des Sauerstoffs entstehen freie Radikale (freies Radikal = Atom, Atomgruppe oder Molekül mit einem ungepaarten Elektron in einem äußeren Orbital), die sehr reaktive und zum Teil stark toxische Zwischenprodukte darstellen. Die reaktivste Form ist das Hydroxylradikal, OH (21), das mit allen organischen Verbindungen in diffusionskontrollierter Geschwindigkeit reagiert. Die Entstehung dieses Radikals erfolgt neueren Arbeiten (33, 61) zufolge über eine "Katalysierte Haber-Weiss Reaktion", bei der Metallkomplexe (z. B. komplex gebundenes Eisen) als Redox-Katalysatoren fungieren:

(1) Fe^{3+} (Komplex) + $\cdot O_2^-$ ⟶ Fe^{2+} (Komplex) + O_2;

(2) Fe^{2+} (Komplex) + H_2O_2 ⟶ Fe^{3+} (Komplex) + $\cdot OH + OH^-$;

In einem biologischen System wäre nach dieser Vorstellung die Bildung von Superoxidradikalen, $\cdot O_2^-$, eine Voraussetzung zur Entstehung des Hydroxylradikals.

1.2. Superoxiddismutasen: Vorkommen und Funktion

Superoxiddismutasen (syst. EC 1.15.1.1.) sind in der Lage, die zelluläre Superoxidradikal-Konzentration und somit auch die Entstehung der Folgeprodukte in der Reduktionskette des Sauerstoffs zu kontrollieren, indem sie die spontane Dismutation von Superoxidradikalen (Spontandismutationsrate $k \sim 10^6$ $M^{-1}sec^{-1}$ bei pH 7,0) mit einer Geschwindigkeitskonstante von $k \sim 10^9$ $M^{-1}sec^{-1}$ bei pH 7,0 um den Faktor 1000 beschleunigen.

Das entstehende Wasserstoffperoxid wird durch die Katalase und die Peroxidasen in der Zelle zu Wasser und molekularem Sauerstoff abgebaut. Die Enzym-katalysierte Sauerstoffdismutation erfolgt nach der Gleichung:

$$\cdot O_2^- + \cdot O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2;$$

Mc Cord und Fridovich gelang es 1969 erstmals (62), die enzymatische Funktion des als Erythrocuprein bekannten (55) und bis dato bereits vielfach isolierten (15, 89) Kupferproteins nachzuweisen. Seitdem wird dieses Metalloprotein als Cu_2Zn_2 Superoxiddismutase bezeichnet.
Neben der Kupfer und Zink enthaltenden Superoxiddismutase, die bisher mit einer Ausnahme (74) nur im Cytoplasma von Eukaryonten nachgewiesen werden konnte, gibt es eine phylogenetisch sehr interessante Mangan-haltige Variante, die man sowohl in Prokaryonten wie auch - als mitochondriales Enzym - in Eukaryonten finden kann, sowie eine fast ausschließlich (82) in Prokaryonten vorkommende Eisen-haltige Superoxiddismutase.
Superoxiddismutasen sind nicht, wie zu erwarten wäre, nur bei Aerobiern zu finden, sondern wurden auch schon bei obligaten Anaerobiern nachgewiesen (37).

1.3. Superoxidradikale in vivo und die biologische Bedeutung von Superoxiddismutasen

Viele experimentelle Befunde lassen auf die Beteiligung von Sauerstoffradikalen in biologischen Prozessen schließen.
$\cdot O_2^-$-Radikale entstehen in vivo z. B. bei der monovalenten Sauerstoffreduktion durch Xanthinoxidase (28), Flavindehydrogenase (27, 66), und Peroxidasen (32) oder bei der Bestrahlung von lebendem Gewebe (8, 73).

Ihre Beteiligung wird vermutet bei:
Lysosomaler Peroxidation (26), Mitochondrialer Atmung (11, 20), Entzündung (1, 17, 64, 78, 83), Phagocytose (43, 44, 64, 77, 86), Mutation und Krebs (52, 67, 80, 91, 99) und Biologischer Strahlenwirkung (8, 73).
In zahlreichen Arbeiten wurde die Rolle der Superoxiddismutase bei Entzündungsprozessen (19, 47, 50, 59, 75, 76, 84), Krebs (5, 6, 10, 39, 40, 41, 68, 72, 98) und anderen pathologischen Prozessen (13, 16, 30, 42, 70, 88) untersucht und auf ihre Schutzwirkung hingewiesen.

1.4. Engere Problemstellung

Während die Zahl der Arbeiten, in denen die Aktivität von Superoxiddismutasen in Zell- oder Gewebshomogenaten bestimmt wird, kaum zu überblicken ist, ist die Literatur, in der die Cu/Zn Superoxiddismutase aus Zellen oder Gewebsmaterialien isoliert wurde (3, 4, 35, 39, 45, 62, 65, 85, 95, 97), überschaubar geblieben.

1981 wurde erstmals Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz und maligner Lymphommilz des Menschen isoliert und im Vergleich nach pulsradiolytischen Untersuchungen für das Enzym aus malignem Gewebe eine deutlich niedrigere Geschwindigkeitskonstante angegeben (39).

In der hier vorliegenden Arbeit wird die Isolierung des Enzyms aus normaler Rindermilz durchgeführt und der Präparation von Cu/Zn Superoxiddismutase aus der Milz eines Rindes mit serologisch nachgewiesenem Antikörper gegen das Bovine Leukämie-Virus, BLV (1.2.3.2.3), welches als der Erreger der enzootischen lymphatischen Rinderleukose bekannt ist (9), gegenübergestellt.

Es soll untersucht werden, ob sich beim Vergleich der spezifischen Aktivität dieser gereinigten Enzyme aus Milzgewebe gleicher Species Unterschiede ergeben. Dies soll ermöglichen, im Fall unterschiedlicher Aktivitätskonstanten auf mögliche strukturelle Unterschiede zwischen diesen vergleichbaren Enzymen aufmerksam zu werden, die mit einer Aktivitätsbestimmung in Rohhomogenaten nicht erfaßt werden.

Um einen Vergleich zum entsprechenden Humanenzym anstellen zu können, wurde zusätzlich Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten isoliert und bezüglich seiner enzymatischen und strukturellen Eigenschaften den gereinigten Rinderenzymen gegenübergestellt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Geräte

Amicon, Witten	Ultrafiltrationsgerät Modell 12 Diafiltrationsapparatur Modell CDS 10
Beckman, München	Spektralphotometer M 35
Braun, München	Frigo Mix
Desaga, Heidelberg	Elektrophoreseapparatur Leuchtschirm
Du Pont, USA	Sorvall RC-5 Zentrifuge
Heraeus Christ, Osterode	Cryofuge 6-6
Fa. Hölzl, Dorfen	Flachgel-Elektrophoresekammer
Instrum. Lab./USA	Atomabsorptions-Spektrophotometer
	Hohlkathodenlampen für Kupfer und Zink

LKB Prod., Bromma, Schweden	2117 Multiphor mit Stromspannungsgerät Fraktionssammmler Ultrorac 7000 mit Uvicord
Original Hanau	UV-Licht-Bestrahlungs- anlage Fluotest
Pharmacia, Freiburg	Peristaltic Pump P 1 Chromatographiesäulen K9/15, K16/40, K26/70, K50/100
Sartorius, Göttingen	elektrische Waage
WTW, Weilheim	pH-Meter pH DIGI 520 Konduktometer LF 42

2.2. Chemikalien und Reagenzien

Behring, Marburg	Rinderalbumin-Standard
Boehringer, Mannheim	Riboflavin
	Xanthinoxidase Kat. Nr. 110434
Deutsche Pharmacia, Freiburg	Pharmalyte (pH 4,0 - 6,5)
	Sephadex CM-50
	Sephadex DEAE A-50
	Sephadex G-25
	Sephadex G-75
Diagnostic Data Lab., USA	Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindererythrocyten
Serva, Heidelberg	Acrylamid
	Bisacrylamid
	Bromphenolblau
	Coomassie Brilliant Blau R 250
	Molekulargewichtsmarker Kat. Nr. 29064 (29000 - 170000 Dalton)
	Natriumdodecylsulfat (SDS)
	Nitrotetrazoliumblau (NBT)
	Protein-Testmischung 9 für Polyacrylamidgele
	Tetramethyläthylendiamin (Temed)
Sigma, Taufkirchen	Cytochrom c aus Pferdeherz
	Hämoglobin-Testkit
	Xanthin

Die sonst benutzten Substanzen wurden von Merck, Darmstadt bezogen.

Das verwendete Wasser war deionisiert und quarzdestilliert, das für die Pulsradiolyse verwendete Wasser war dreimal destilliert und pyrrolisiert.

2.3. Methoden

2.3.1. Allgemeine Methoden

2.3.1.1. Proteinnachweis durch direkte Messung bei A_{280nm}

Proteinlösungen lassen sich qualitativ und semiquantitativ nachweisen, indem die Absorption im UV-Bereich ($A_{280\ nm}$) gegen Wasser oder Puffer in Quarzküvetten gemessen wird. Bei dieser Wellenlänge absorbieren nur die aromatischen Aminosäuren. Der relative Anteil dieser Aminosäuren am Gesamtprotein ist die Meßgröße.

2.3.1.2. Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry (54)

Die Bestimmung ($A_{578\ nm}$) basiert auf zwei chemischen Reaktionen:

a) Entstehung eines farbigen Kupferkomplexes mit den Peptidbindungen des Proteins.

b) Reduktion von Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdän (= Folin-Ciocalteus-Reagenz) durch die aromatischen Aminosäuren des Proteins.

Die Empfindlichkeit des Testverfahrens erlaubt eine reproduzierbare quantitative Proteinbestimmung in einem Bereich von 30 - 200 µg Protein/ml Lösung.

Testsubstanzen (vor jeder Bestimmung frisch herzustellen):

1) Albumin-Standardlösung: 25 mg Rinderserumalbumin
in 25 ml Aqua bidest.

2) Natriumcarbonat-/Kalium-natriumtartrat-Lösung: 2 g Na_2CO_3
20 mg $NaKC_4H_4O_6 \times 4 H_2O$
ad 100 ml 0,1N NaOH

3) Kupfersulfat-Lösung (0,2%) 50 mg $CuSO_4 \times 5 H_2O$
in 10 ml Aqua bidest.

4) Reagenz nach Folin-Ciocalteus (Fa. Merck, Darmstadt)

I) Mischung A 50 ml Lösung (2)
1 ml Lösung (3)

II) Mischung B 5 ml Lösung (4)
9 ml Aqua bidest.

Bestimmungsansatz (Doppelbestimmung):

Meßstrahlung: Hg 578 nm; Schichtdicke: 1 cm;
Testvolumen: 6,5 ml; Raumtemperatur.

In Reagenzgläser pipettieren:	Leerwert (ml)	Standard (ml)				Probe (ml)
Wasser	1,00	0,975	0,95	0,90	0,85	-
Serumalbumin (1)	-	0,025	0,05	0,10	0,15	-
Probe	-	-	-	-	-	1,00
Mischung A (I)	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
mischen, genau 10 min bei Raumtemperatur inkubieren,						
Mischung B (II)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
mischen, 30 min bei Raumtemperatur stehenlassen; dann Extinktionen der Probe und des Standards gegen Extinktion des Leerwertes messen.						

Aus den ermittelten Extinktionen für die 4 Standardverdünnungen wird eine Eichgerade errechnet und auf Millimeterpapier gezeichnet. Die Proteinkonzentration wird über diese Standard-Eichgerade bestimmt. Bei den jeweiligen Proteinbestimmungen an verschiedenen Tagen werden die Standards mitgeführt und mit der Eichgeraden verglichen.

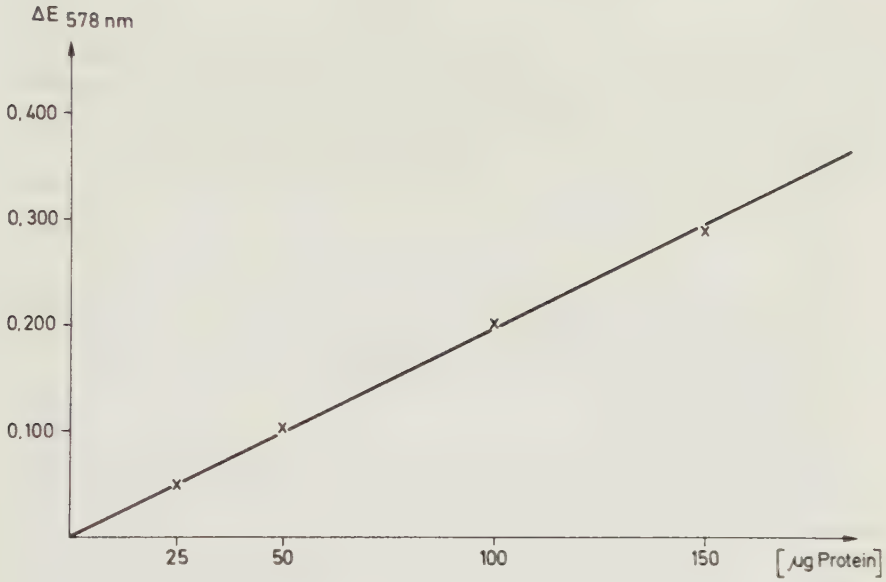


Abb. 1 : Eichgerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Lowry (54). Zur Erstellung der Eichgeraden dienten vier Standards, die aus einer Rinderserumalbumin-Standardlösung (BSA: 1 mg/ml) hergestellt wurden. Als Leerwert wurde eine Probe ohne BSA verwendet.
Testvolumen: 6,5 ml.
Abszisse: eingesetzte Menge des BSA-Standards (µg Protein)
Ordinate: $\Delta E_{578\ nm}$ des BSA-Standards gegen Leerwert gemessen, Schichtdicke 1 cm.
Korrelation: 0,998

2.3.1.3. Bestimmung der Proteinkonzentration gereinigter Cu/Zn Superoxiddismutase über deren molaren Absorptionskoeffizienten

Es wird die Extinktion der gelösten Cu/Zn Superoxiddismutase bei einer charakteristischen Wellenlänge (Quarzküvette, Schichtdikke 1 cm) gegen das Lösungsmittel als Leerwert gemessen.
Die Auswertung folgt dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$c = \frac{E}{\varepsilon \times d} ;$$

c = Proteinkonzentration (mol/l)
E = gemessene Extinktion bei 266 nm (Humanenzym) bzw. 259 nm (Rinderenzym)
d = Schichtdicke (cm)
ε = molarer Absorptionskoeffizient (M^{-1} cm^{-1})

Der molare Absorptionskoeffizient beträgt:
9840 bei der bovinen Cu/Zn Superoxiddismutase (97)
18700 bei der humanen Cu/Zn Superoxiddismutase (89)

Mit Hilfe des jeweiligen Molekulargewichts wird auf die Proteinkonzentration (mg/ml) der Lösung umgerechnet.

2.3.1.4. Hämoglobinbestimmung (93)

Prinzip:

Kaliumferricyanid oxidiert Fe^{2+} - Hämoglobin zu Fe^{3+} - Hämiglobin, welches mit Kaliumcyanid unter Bildung von Fe^{3+} - Hämiglobincyanid reagiert. Diese stabile Verbindung wird bei $A_{540\ nm}$ photometrisch gemessen. Der Extinktionsverlauf ist linear abhängig von der Hämoglobinkonzentration.

Bestimmungsansatz (Doppelbestimmung)

Methämoglobin-Stand.lsg.
(g/100 ml)

	Leerwert	6,0	12,0	18,0	Probe
Methämoglobin-Standard-Lösung	---	2,0 ml	4,0 ml	6,0 ml	---
Drabkin'sche Lösung	6,0 ml	4,0 ml	2,0 ml	---	5,0 ml
Probe	---	---	---	---	20 µl

mischen, 30 min bei Raumtemperatur stehenlassen

Durchführung:

Die Bestimmung der Hb-Konzentration einer Probelösung erfolgt über eine Eichgerade, die aus einer Verdünnungsreihe einer Methämoglobin-Standardlösung erstellt wird. Die Standardverdünnungen und der Leerwert-Ansatz werden mit Drabkin'scher Lösung hergestellt. Die Eichlösungen werden bei $A_{540\ nm}$ gegen den Leerwert gemessen. Bei jeder Hb-Bestimmung in Probelösungen werden der Leerwert und die Original-Standardlösung zur Kontrolle mitgemessen.

Für die Hb-Bestimmung in Probelösungen werden zu je 5,0 ml Drabkin'scher Lösung 20 µl Probelösung (Vollblut bzw. Isolierungsproben) zugegeben, gut gemischt und 30 min bei Zimmertemperatur zur Inkubation stehengelassen. Die Messung erfolgt bei $A_{540\ nm}$ gegen den Leerwert (Drabkin'sche Lösung). Anschließend wird die Hämoglobinkonzentration rechnerisch über die Eichgerade ermittelt.

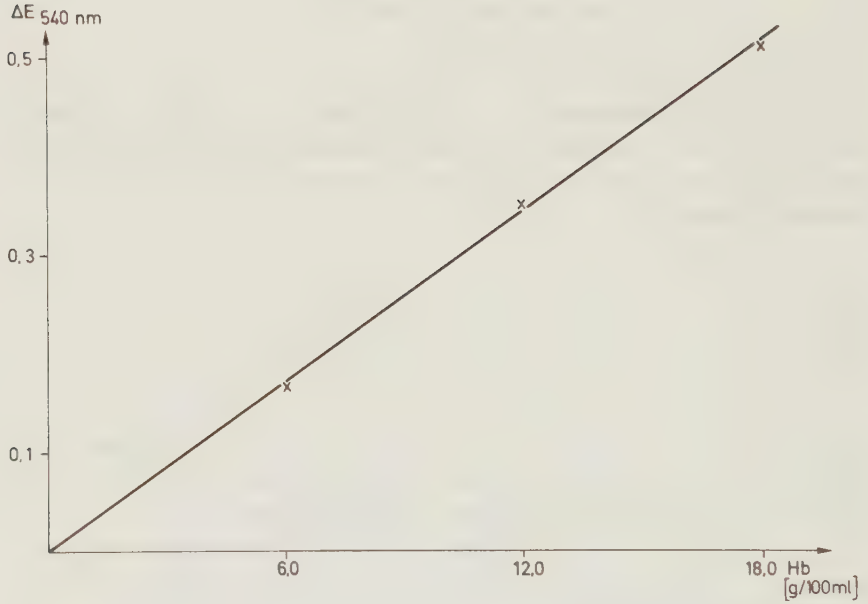


Abb. 2 : Eichgerade zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration nach der Hämiglobincyanid-Methode (93).
Zur Erstellung der Eichgerade dienten Cyanmethämoglobin-Standardlösungen (18 g Hb / 100 ml, 12 g Hb / 100 ml, 6 g Hb / 100 ml).
Abszisse: Eingesetzte Menge des Cyanmethämoglobin-Standards (g Hb / 100 ml).
Ordinate: $\Delta E_{540\ nm}$ des Standards gegen Leerwert (Drabkin'sche Lösung) gemessen, Schichtdicke 1 cm.
Korrelation: 0,998.

2.3.1.5. Konduktometrie

Mit dem Verfahren der Konduktometrie (Messung der elektrischen Leitfähigkeit) ist es möglich, über den ionalen Ladungstransport mittels einer speziellen Elektrode ein Maß für die Ionenstärke eines Elektrolyten (z. B. Pufferlösung) zu erhalten.
Zu beachten ist dabei, daß das Leitvermögen stark temperaturabhängig ist (Temperaturkoeffizient 1 - 3 % pro °C). Ein spezieller Temperaturmeßfühler ermöglicht eine automatische Temperaturkompensation. Die in dieser Arbeit vorgelegten Leitfähigkeitsmessungen von gepufferten Salzlösungen erfolgten unter Temperaturkontrolle (Gerät LF 42 der Firma WTW, Weilheim).

2.3.1.6. Dialyse

Durch Zwischenschalten einer Porenmembran, die infolge ihrer geringen Porengröße für kolloide Teilchen nicht mehr durchlässig ist, zwischen zwei Flüssigkeiten mit unterschiedlichen Ionenkonzentrationen, erfolgt - dem Prinzip der Diffusion entsprechend - ein Konzentrationsausgleich durch Wanderung der Ionen und der molekulardispers gelösten Teilchen in Richtung des Konzentrationsgefälles. Die kolloiden Teilchen (z. B. Proteine) werden von der Dialysemembran zurückgehalten.
Auf diese Weise läßt sich die Ionenkonzentration einer Flüssigkeit einstellen.
Die bei der hier vorliegenden Arbeit verwendete Dialysemembran hatte eine Ausschlußgrenze von 20000 Dalton.

2.3.1.7. Ultrafiltration

Das Verfahren der Ultrafiltration ermöglicht die Konzentration dispers gelöster Teilchen durch Abpressen des Dispersionsmittels, in dem sie gelöst sind.
In eine luftdicht und überdruckfest verschlossene Ultrafiltrationskammer, welche mit der zu filtrierenden Probelösung gefüllt ist, wird ein träges Gas (z. B. Stickstoff) über ein Überdruckventil mit einem Druck bis zu 5 bar eingeleitet.
Zwischen Flüssigkeit und Kammerauslauf ist eine Porenmembran geschaltet, deren Porengröße entsprechend dem Molekulargewicht der zu konzentrierenden Substanz gewählt wird. Auf diese Weise kann das Dispersionsmittel abfließen, während die kolloiden Teile (z. B. Proteine) mit einem Molekulargewicht, welches höher liegt als die Ausschlußgrenze der Ultrafiltrationsmembran, zurückgehalten werden.

2.3.1.8. Diafiltration

Dieses Verfahren ermöglicht die Veränderung der Ionenkonzentration einer Probelösung innerhalb kurzer Zeit.
Es basiert auf der Technik der Ultrafiltration. Zusätzlich wird durch eine gesonderte Zuleitung, die mit einem in das Überdrucksystem integrierten Flüssigkeitsreservoir verbunden ist, der Flüssigkeitsspiegel in der Ultrafiltrationskammer konstant gehalten. Auf diese Weise wird so lange diafiltriert, bis die Ionenkonzentration der Probelösung in der Ultrafiltrationskammer gleich der der Reservoirflüssigkeit ist. Das Gesamtvolumen, welches dazu aus dem Reservoir über die Ultrafiltrationskammer laufen muß (Diafiltrationsvolumen), berechnet sich folgendermaßen:

$$Dv = \ln \frac{M_A}{M_E} \times Av$$

Dv = Diafiltrationsvolumen
Av = Ausgangsvolumen der zu diafiltrierenden Probelösung
M_A = Molarität der Probelösung vor Diafiltration
M_E = Molarität der Reservoirflüssigkeit (= gewünschte Molarität der Probelösung nach Diafiltration)

2.3.2. Isolierung von Cu/Zn Superoxiddismutase

2.3.2.1. Prinzip

Der Isolierung des Enzyms aus Gewebe wurde die Isolierungsmethode von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Hühnerleber nach Weisiger und Fridovich zugrundegelegt (95).
Im Prinzip zerfällt der Trennungsgang in zwei Abschnitte. Nach Gewinnung des Rohprodukts durch klassische Methoden wie Aussalzen und Ausfällen der Proteine mit organischen Lösungsmitteln erfolgt im weiteren Trennungsgang die Reinigung des Enzyms durch säulenchromatographische Methoden.

2.3.2.2. Trennungsgang

Nach der Gewinnung des Rohhomogenats wird in Anlehnung an die Tsuchihashi-Fraktionierung (92) das Hämoglobin durch Äthanol/Chloroform (0,25 Vol.-Teile und 0,15 Vol.-Teile) gefällt.

Der Chloroform/Äthanol-Überstand wird durch Zugabe von festem K_2HPO_4 in eine obere leichte äthanolische Phase mit der Hauptmenge an Cu/Zn Superoxiddismutase und eine untere schwere wässrige Phase mit der Hauptmenge an Salzen getrennt. Anschließend wird das Rohprodukt mit Aceton (0,8 Vol.-Teile) gefällt und das Protein nach Aufnahme in einem kleinen Volumen Puffer ausgiebig dialysiert.

Zunächst erfolgt eine diskontinuierliche Chromatographie (batch-Verfahren) an Carboxymethyl-Cellulose (Kationenaustauscher), wobei nach Wegwaschen von ungebundenem Protein das vorgereinigte Produkt bei höherer Salzkonzentration eluiert wird. Nach Einengung des Volumens durch Ultrafiltration wird eine Gelfiltration über Sephadex G-75 durchgeführt. Die Fraktionen mit Superoxiddismutase-Aktivität werden gepoolt und erneut ultrafiltriert. Im letzten Reinigungsschritt erfolgt eine kontinuierliche Chromatographie an DEAE-Cellulose (Anionenaustauscher). Nach Entsalzen der ultrafiltrierten Endstufe über Sephadex G-25 wird das gereinigte Enzym nach proteinchemischen Gesichtspunkten näher charakterisiert (siehe Spezielle analytische Methoden 2.3.5.).

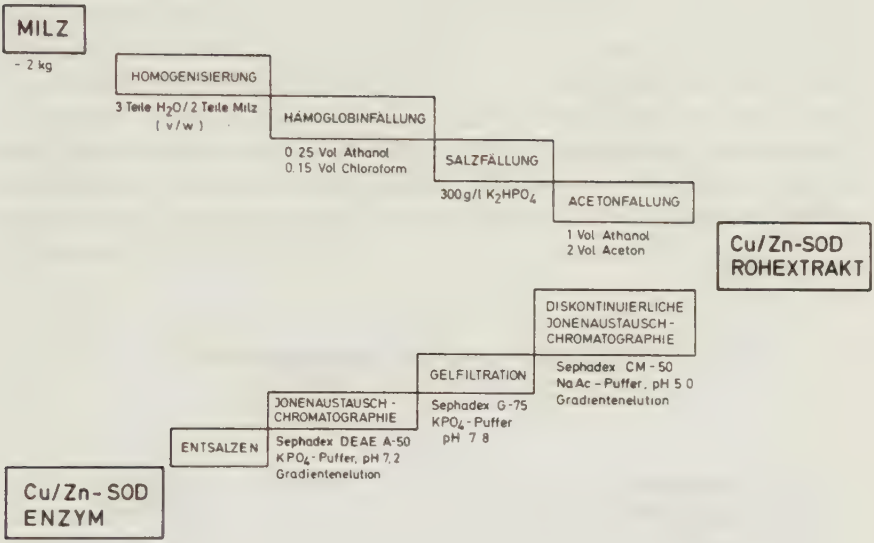


Abb. 3 : Schematische Darstellung des Trennungsganges zur Isolierung von Cu/Zn Superoxiddismutase (SOD) aus lymphatischem Milzgewebe.

2.3.3. Enzymaktivitätsbestimmung der Superoxiddismutase - Indirekte Methode

Zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der Enzymaktivität stehen zwei grundsätzlich verschiedene Methoden zur Verfügung.

Indirekte Methode

Bei dieser Methode wird häufig ein chemisches Reaktionssystem verwendet, das im ersten Reaktionsschritt in Anwesenheit von Sauerstoff $\cdot O_2^-$-Radikale liefert (Elektronen generierendes System) und in einem zweiten Schritt durch Elektronenübertragung vom $\cdot O_2^-$-Radikal einen geeigneten Reaktionspartner reduziert (Elektronen aufnehmendes System). Die Superoxiddismutase konkurriert mit diesem zweiten Reaktionsschritt durch katalytisches Umsetzen der $\cdot O_2^-$-Radikale und läßt sich durch die Stärke der Reduktionshemmung quantitativ und qualitativ nachweisen (siehe Abb. 4).

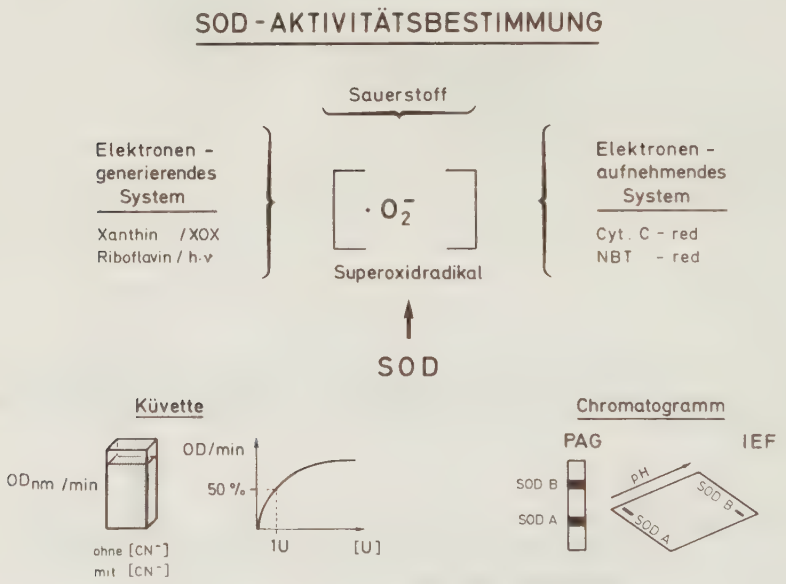


Abb. 4 : Allgemeine Darstellung des Cytochrom c Reduktionshemmtests (Küvettentest, Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau (NBT) auf Polyacrylamidgel (PAG) und nach isoelektrischer Fokussierung (IEF) als indirekte Verfahren zur Bestimmung der Superoxiddismutase (SOD)-Aktivität (siehe Mat. und Methoden 2.3.3.1. und 2.3.3.3.).

SOD A : Cyanid (Cn^-)-sensitive Superoxiddismutase (enthält Kupfer und Zink).

SOD B : Cyanid (Cn^-)-insensitive Superoxiddismutase (enthält Mangan).

XOX : Xanthinoxidase

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Cytochrom c-Reduktionshemmtest, der Nitritformationshemmtest und die Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau als gebräuchliche indirekte Testverfahren der Superoxiddismutase - Aktivitätsbestimmung verwendet.

2.3.3.1. Hemmung der Reduktion von Cytochrom c in Lösung

2.3.3.1.1. Prinzip

Zur Generierung der Superoxidradikale als Reduktionsäquivalente dient in diesem Test die katalytische Umsetzung von Xanthin durch die Xanthinoxidase, in deren Verlauf $\cdot O_2^-$-Radikale gebildet werden (28, 63).
Das dreiwertige Eisen, welches in der HÄM-Gruppe des Cytochrom c komplex gebunden ist, wird von $\cdot O_2^-$ zu zweiwertigem Eisen reduziert. Diese Reaktion ist durch eine Änderung des Absorptionsspektrums gekennzeichnet und läßt sich photometrisch bei 550 nm verfolgen, da (Fe^{2+}) Cytochrom c bei dieser Wellenlänge ein charakteristisches Absorptionsmaximum aufweist.

Es ergibt sich folgende Reaktionsgleichung:

1. $\text{Xanthin} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{Xanthinoxidase}} \text{Hypoxanthin} + 2H^+ + \cdot O_2^-$

2. $\cdot O_2^- + (Fe^{3+})\ \text{Cytochrom c} \longrightarrow O_2 + (Fe^{2+})\ \text{Cytochrom c}$

Die Kinetik der Reduktion von Cytochrom c (Nullwert) und ihre Hemmung (Probe) wurde für die quantitative Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität verfolgt.

2.3.3.1.2. **Lösungen für den Testansatz:**

1) 0,05 M KPO_4-Puffer, pH 7,8 (sauerstoffgesättigt durch Einleitung von gasförmigem Sauerstoff über zwei Stunden, 4°C).

2) Di-Natrium-EDTA $3 \cdot 10^{-3}$ M (4°C)
112 mg EDTA
ad 100 ml H_2O bidest.

3) Xanthin $1,5 \cdot 10^{-3}$ M (4°C; frisch hergestellt)
11,4 mg Xanthin in 2,5 ml 0,1 N NaOH lösen
ad 50 ml H_2O bidest.

4) Cytochrom c $3 \cdot 10^{-4}$ M
37,2 mg Cytochrom c (Fe^{3+}) (4°C, frisch hergestellt)
ad 10 ml H_2O bidest.

Zur Kontrolle dient die Extinktionsmessung der 1:10 verdünnten Stammlösung:
$OD_{550nm} = 0,300 (\pm 0,02)$/gegen Luft.

2.3.3.1.3. Testansatz:

	Leerwert	Nullwert	Probe/Standard
Puffer (µl)	2500	2500	2500
aqua bid.(µl)	200	100	---
EDTA (µl)	100	100	100
Xanthin (µl)	100	100	100
Cytochrom c (µl)	100	100	100
Probe/Standard-Verdünnung (µl)	---	---	100
gut mischen, 30 sec stehenlassen			
Xanthinoxidase (µl) (80 mU/ml)	---	100	100
Gesamtvolumen (µl)	3000	3000	3000

Beckman Spektralphotometer Modell 35
$OD_{550\ nm}$ /Luft

3 Messungen: Meßdauer ca. 10 sec; Meßintervall 60 sec
Spreizung 0 - 0,2 A; Schreibervorschub
2 inch/min (50,8 mm/min)
Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung angesetzt.

Die einzelnen Testlösungen müssen auf Eis gekühlt sein und zügig pipettiert werden (ca. 5 Doppelbestimmungen pro Ansatz), um bei der Temperaturempfindlichkeit des kinetischen Testverfahrens eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten (bei einer Erhöhung der Meßtemperatur von 20 °C auf 37 °C verdoppelt sich die Geschwindigkeit der Reduktionskinetik).

Sofort nach kurzem Rühren im Anschluß an die Zugabe des Startreagenzes Xanthinoxidase wird die Messung der Kinetik begonnen und über ca. 3 Minuten graphisch mittels Direktschreiber erfaßt.

2.3.3.1.4. Quantitative Auswertung

Die Meßdaten wurden für die quantitative Bestimmung der Superoxiddismutase nach folgenden Gesichtspunkten ausgewertet:
Der Leerwert diente als Kontrollparameter für die Konstanz der Ausgangsbedingungen und betrug bei OD_{550nm} 0,132 ($\pm$0,07).
Der Nullwert ist definiert als die ungehemmt ablaufende Reduktions-Kinetik, welche als Extinktionsänderung pro Zeiteinheit (ΔE_{550nm}/min) gemessen wird.

Definitionsgemäß entspricht 1 Unit Superoxiddismutase-Aktivität einer 50%igen Hemmung der Nullwertkinetik.

Zur Ermittlung der Eichgerade - sie wurde an jedem Versuchstag neu aufgestellt - wurden folgende Standard-Verdünnungen eines Referenzenzyms (Rindererythrocyten Cu/Zn Superoxiddismutase, Diagnostic Data USA), ausgehend von einer Stammlösung der Konzentration 1 mg/ml, hergestellt und gemessen:
1:200 - 1:400 - 1:600 - 1:1200

Eine Linearität der Standard-Eichkurven läßt sich durch Auftragen der Werte auf Logit-Papier erzielen (49). Bei diesem Verfahren werden auf der Abszisse die Verdünnungen bzw. Units im dualen Logarithmus, auf der Ordinate die Änderung der OD_{550nm} pro Minute in konventionellem Maßstab aufgetragen. Für die Verdop-

pelung einer Verdünnung wurden auf der Abzisse 4 cm als Abstand festgelegt.
Die Verdünnung am Koordinaten-Schnittpunkt wurde willkürlich auf 1:100 festgesetzt.
Folgende Formel ermöglicht die Skalierung der Abszisse entsprechend dem dualen Logarithmus:

$$c = \frac{4}{\ln 2} \cdot (\ln x - \ln 100)$$

c: cm auf der Abszisse
x: Verdünnung an der gesuchten Stelle

Zur Ermittlung der Verdünnung (1:n), bei welcher die Standard-Cu/Zn Superoxiddismutase eine Aktivität von 1 Unit aufweist, ist die folgende Umwandlung obiger Gleichung erforderlich:

$$x = \text{anti ln} \left(\frac{c \cdot \ln 2}{4} + \ln 100\right)$$

c ergibt sich aufgrund der Definition als Funktion des halben $\Delta E_{550nm}/min$ - Wertes vom Nullwert.

In gleicher Weise wird die Verdünnung der Standard-Superoxiddismutase ermittelt, welche der Aktivität einer Probe entspricht (Verdünnung 1:m).
Die Aktivität (A) der Probe in Units/ml berechnet sich aus:

$$A = \frac{n}{m} \cdot 10 \cdot \text{Verdünnung der Probe;}$$

Der Faktor 10 berücksichtigt das im Test eingesetzte Probenvolumen von 100 µl.
Ferner wurde für jede Probe eine Verdünnung gewählt, welche in ihrer Aktivität im Bereich von 0,6 bis 1,4 U/100µl lag, da die Zuverlässigkeit der Bestimmung um 1 U/100µl am größten ist.

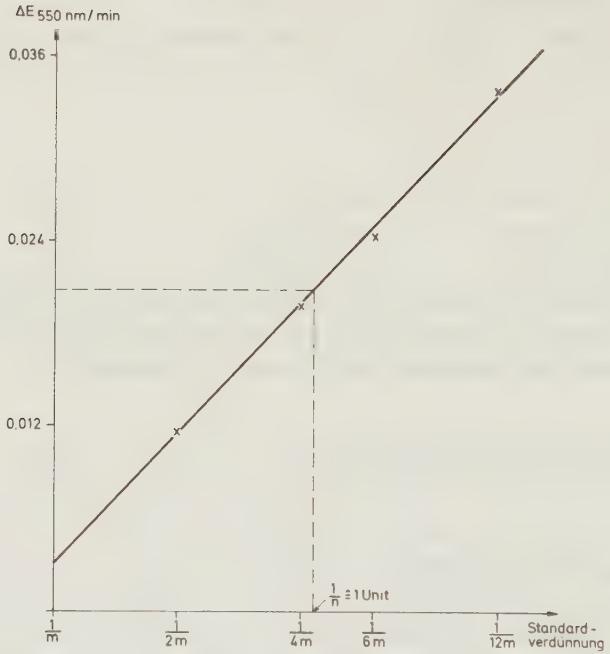


Abb. 5 : Cytochrom c-Reduktionshemmtest: Eichgerade zur Ermittlung der Superoxiddismutase-Aktivität über die Hemmung der Reduktion von Cytochrom c.
Zur Erstellung der Eichgerade dienten vier Verdünnungen einer Cu/Zn Superoxiddismutase-Standardlösung aus Rindererythrocyten (1 mg/ml); die Auftragung erfolgte auf Logit-Papier (siehe Text).
Abszisse: Verdünnungen der Superoxiddismutase-Standardlösungen ($\frac{1}{m}$; $\frac{1}{2m}$; ....;). $\frac{1}{n}$ = Standardverdünnung, welche der Aktivität 1 Unit entspricht.
Ordinate: gemessene Cytochrom c Reduktion ($\Delta E_{550\ nm}$/min).
1 Unit ist definiert als die Superoxiddismutase-Aktivität, welche die gemessene Cytochrom c Reduktion ($\Delta E_{550\ nm}$/min) ohne Superoxiddismutase (Nullwert) zu 50 % hemmt.
Korrelation: 0,999
Für jeden Meßtag wurde eine neue Eichgerade erstellt.

2.3.3.1.5. Abhängigkeit der Aktivität der Cu/Zn Superoxiddismutase von verschiedenen Cyanid-Konzentrationen

Die Aktivität der Cu/Zn Superoxiddismutase ist durch Cyanid hemmbar (95), wobei der Angriffspunkt des Cyanids am aktiven Zentrum des Metallproteins bekannt ist (24). Die Zugabe von Natriumcyanid zum oben beschriebenen Testansatz erfolgt in verschiedenen Konzentrationen und wird anstelle von 100 µl Puffer eingesetzt.

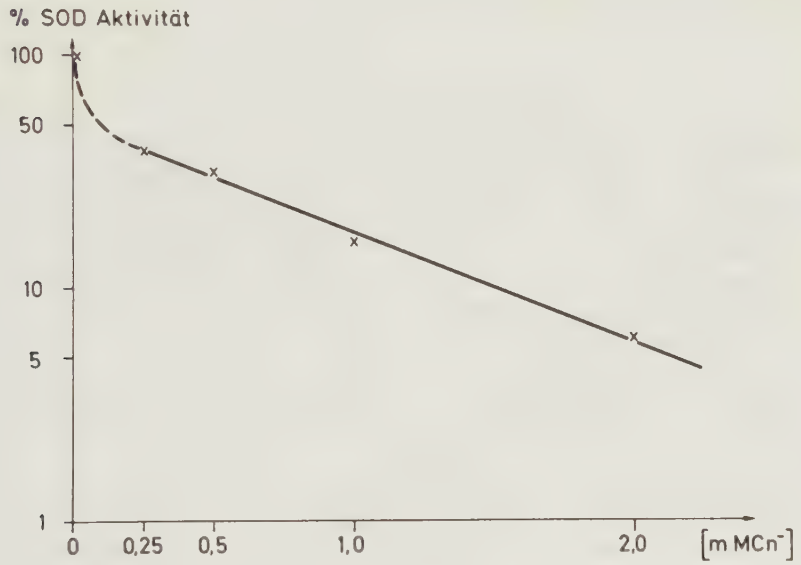


Abb. 6 : Cytochrom c-Reduktionshemmtest: Darstellung der Abhängigkeit der Cu/Zn Superoxiddismutase-Aktivität von verschiedenen Cyanid-Konzentrationen (0 - 2 mM) im Testansatz.
Abszisse: Cyanid-Konzentration im Testansatz (mM).
Ordinate (logarithmischer Maßstab): Aktivität einer bovinen Cu/Zn Superoxiddismutase (100 %), welche im Testansatz ohne Cyanid eine Aktivität von 1 Unit aufweist.
Korrelation der Meßwerte (Cyanid-Konzentration 0,25 - 2 mM): - 0,998

Steigende Cyanidkonzentrationen bis zu 3 mM Cyanid im Testvolumen zeigen eine lineare Abhängigkeit der Cytochrom c - Reduktionshemmung von der Cyanidkonzentration. Die Parallelität der Hemm-Geraden deutet darauf hin, daß die Kinetik der Reduktionshemmung im Bereich der angegebenen Konzentrationen (0,5 - 3,0 mM Cyanid) nur von der Hemmung des Enzyms abhängt. Bei einer Konzentration von 4 mM Cyanid bricht das Testsystem zusammen. Bereits im Nullwert-Ansatz findet keine Reduktion von (Fe^{3+}) Cytochrom c mehr statt. Dies ist möglicherweise auf eine Hemmung der Xanthinoxidase durch Cyanid zurückzuführen (22). Aufgrund dieser Versuchsergebnisse wurde für die Hemmung der Cu/Zn Superoxiddismutase eine maximale Konzentration von 3 mM Cyanid gewählt.

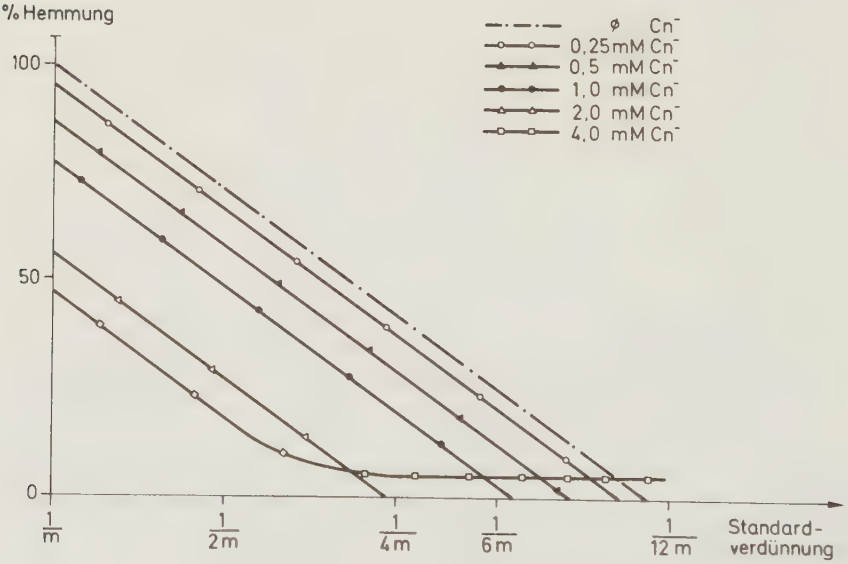


Abb. 7 : Cytochrom c-Reduktionshemmtest: Aktivität der Cu/Zn Superoxiddismutase in Abhängigkeit von (mM) NaCN (Natriumcyanid-Konzentrationen im Testansatz: 0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 2,0 mM, 4,0 mM NaCN).

Abszisse: Verdünnung der Superoxiddismutase-Standardlösung

($\frac{1}{m}$; $\frac{1}{2m}$; ...;)

Ordinate: % Hemmung der Reduktion von Cytochrom c, bezogen auf 0 % Hemmung (Nullwert: Testansatz ohne Superoxiddismutase).

Die % Hemmung der Reduktion von Cytochrom c in Abhängigkeit von Cyanid (mM) wurde in vier verschiedenen Verdünnungen einer bovinen Cu/Zn Superoxiddismutase-Standardlösung (1 mg/ml) untersucht. Die Auftragung erfolgte auf Logit-Papier (siehe Text).

2.3.3.2. Hemmung der Nitritbildung aus Hydroxylammoniumchlorid in Lösung (23, 48)

2.3.3.2.1. Prinzip

Dieses indirekte Verfahren bedient sich, ebenso wie der Cytochrom c - Reduktionshemmtest, eines Systems aus Xanthin/Xanthinoxidase als Quelle zur Bildung der Superoxidradikale. Diese $\cdot O_2^-$-Radikale oxidieren Hydroxylammoniumchlorid zur entsprechenden Nitritverbindung. Das Enzym Superoxiddismutase konkurriert mit diesem zweiten Reaktionsschritt durch katalytisches Umsetzen der $\cdot O_2^-$-Radikale. Die nach einer Inkubationszeit gebildete Menge an Nitrit im reinen Testsystem (Nullwert) im Vergleich zur Nitritbildung bei Zugabe von Enzym (Probe) ist unter definierten Reaktionsbedingungen proportional der Aktivität der Superoxiddismutase. Im Gegensatz zum Cytochrom c-Reduktionshemmtest wird die Hemmung der Nitritbildung nicht kinetisch verfolgt sondern die Menge der gebildeten Nitritverbindung nach einer definierten Reaktionszeit im Sinne einer Endpunktmethode photometrisch bestimmt. Dazu wird in einer Hilfsreaktion die Nitritgruppe in Form einer Azokupplung an Sulfanilsäure gebunden und die Diazoverbindung nach Zugabe von alpha-Naphthylamin durch Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität der Farbbildung wird bei 530 nm gemessen. Die Hemmung dieser Farbbildung stellt indirekt ein Maß für die Superoxiddismutase-Aktivität dar.

2.3.3.2.2. Lösungen für den Testansatz

1) 0,065 M KPO_4 - Puffer pH 7,8 (4 °C, sauerstoffgesättigt)

2)	Xanthin	11,42 mg	
	0,1 N NaOH	2,5 ml	kalt
	H_2O bidest.	7,5 ml	kalt
		10 ml Lösung (frisch hergestellt)	

3)	Hydroxylammoniumchlorid	6,95 mg	
	H_2O bidest.	10 ml	
		10 ml Lösung (frisch hergestellt)	

4)	Xanthinoxidase (0,4 U/mg)	0,1 ml	
	H_2O bidest.	4,9 ml	kalt
		5 ml Lösung (frisch hergestellt)	

5)	alpha-Naphthylamin	0,5 g	
	H_2O dest.	100 ml	kochend
	(abkühlen lassen)		
	Eisessig	125 ml	
	H_2O dest.	275 ml	
		500 ml Lösung (lichtgeschützt aufbewahrt)	

6)	Sulfanilsäure	1,65 g	
	H_2O dest.	375 ml	warm
	Eisessig	125 ml	
		500 ml Lösung	

2.3.3.2.3. Testansatz

	Probenwert	Nullwert
Puffer (µl)	1000	1000
Xanthin (µl)	100	100
Hydroxylammoniumchlorid (µl)	100	100
H_2O bidest. (µl) sauerstoffgesätt.	500	600
Probe (µl)	100	---
	kurz schütteln	
Xanthinoxidase (µl) (80mU/ml)	200	200
	2000 µl	2000 µl
	gut schütteln, genau 30 min im Wasserbad bei 25°C inkubieren	
H_2O bidest.(µl)	1500	1500
Probe/Nullwert (µl)	500	500
Sulfanilsäure (µl)	500	500
	kurz schütteln, 30 Sekunden warten	
alpha-Naphthylamin (µl)	500	500
	gut schütteln, 20 Minuten stehen lassen	

Die angegebenen Inkubationszeiten und Temperaturwerte wurden konstant gehalten. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.3.3.2.4. Quantitative Auswertung

Der Nullwert ergibt sich aus der ungehemmt ablaufenden Nitritbildungsreaktion, deren Quantität nach chemischem Umsatz zum blauen Farbstoff photometrisch durch die Extinktionsmessung bei 530 nm gegen Luft erfaßt wird.
Definitionsgemäß entspricht 1 U Superoxiddismutase-Aktivität einer 50%igen Hemmung der Farbbildung des Nullwertes.

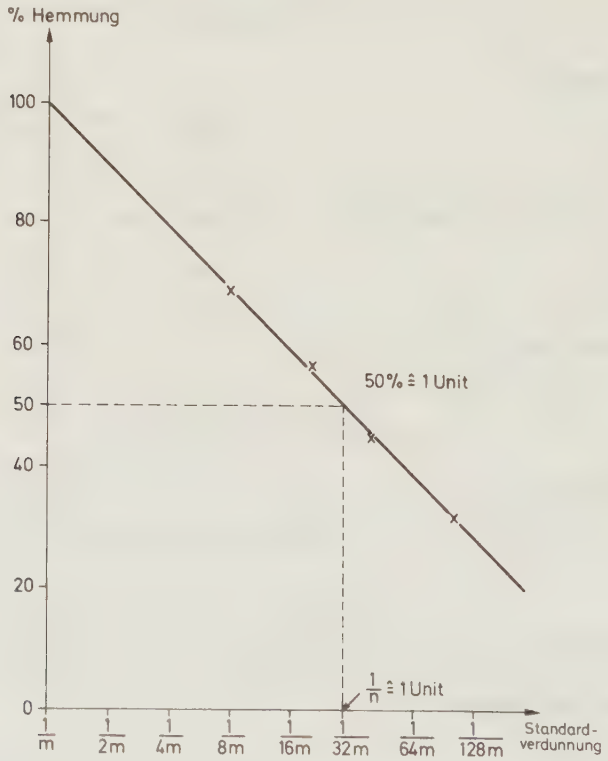


Abb. 8 : Nitritformationshemmtest: Eichgerade zur Berechnung der Superoxiddismutase-Aktivität durch Hemmung der Nitritbildung.
Zur Erstellung der Eichgerade dienten 4 Verdünnungen einer Cu/Zn Superoxiddismutase-Standardlösung (1 mg/ml); Auftragung auf Logit-Papier (s. Text).

Abszisse: Verdünnungen der Superoxiddismutase-Standardlösung ($\frac{1}{m}$; $\frac{1}{2m}$; ...;). $\frac{1}{n}$ = Standardverdünnung, welche der Aktivität 1 Unit entspricht.
Ordinate: % Hemmung der Farbkomplexbildung (Nitritformation) in bezug auf 0 % Hemmung (Nullwert: Testansatz ohne Superoxiddismutase).
Korrelation: -0,999
Für jeden Test wurde eine Eichgerade erstellt.

2.3.3.2.5. Abhängigkeit der Aktivität der Cu/Zn Superoxiddismutase von verschiedenen Cyanidkonzentrationen

Es zeigt sich, daß - ähnlich wie beim Cytochrom c - Reduktionshemmtest - durch Zugabe von Cyanid bis zu einer Konzentration von 3 mM die Linearität der Superoxiddismutase-Aktivität in einer Verdünnungsreihe nicht beeinträchtigt wird.

Andererseits läßt bereits eine Konzentration von 0,25 mM Cyanid im Testansatz die Extinktion des Nullwertes, der der ungehemmten Nitritbildung entspricht, um ca. 30% ansteigen. Dies erklärt sich möglicherweise durch eine konzentrationsunabhängige Beeinflussung der Xanthinoxidase durch Cyanid, welches an dieser einen Übergang vom Ein- zum Zwei- Elektronenschritt bewirkt (22).

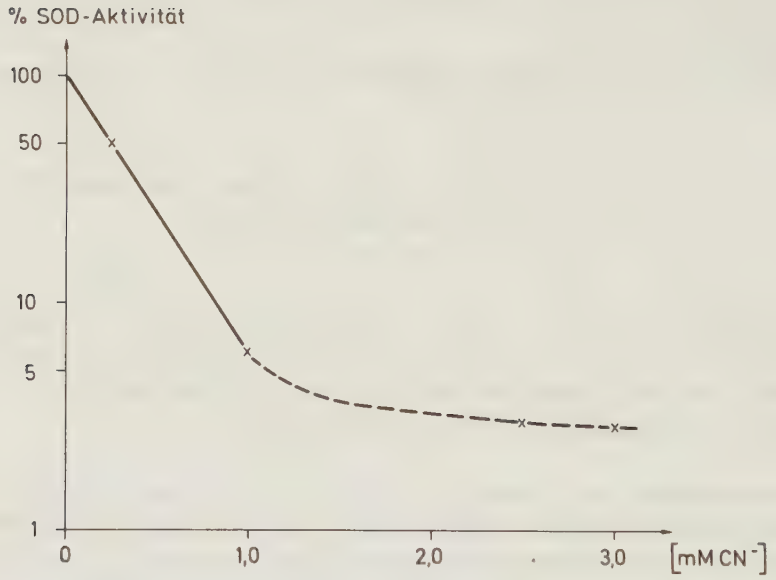


Abb. 9 : Nitritformationshemmtest: Darstellung der Abhängigkeit der Cu/Zn Superoxiddismutase-Aktivität von der Cyanid-Konzentration im Testansatz.
Abszisse: Konzentration des Cyanid im Testansatz (mM)
Ordinate (logarithmischer Maßstab): Cu/Zn Superoxiddismutase-Aktivität (%) bezogen auf die Aktivität einer Cu/Zn Superoxiddismutase (100%), welche im Testansatz ohne Cyanid eine Aktivität von 1 Unit aufweist.

2.3.3.3. Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau

Durch photochemische Aktivierung von Riboflavin in Gegenwart von N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin (TEMED) und Sauerstoff werden $\cdot O_2^-$-Radikale freigesetzt, welche das Nitrotetrazoliumblau zum entsprechenden blauen Formazanderivat reduzieren können. Die Superoxiddismutase konkurriert mit dieser Farbstoffbildung durch katalytisches Umsetzen der $\cdot O_2^-$-Radikale. Dieses indirekte Nachweisverfahren für SOD-aktive Verbindungen läßt sich sowohl in Lösung (7) als auch nach vorheriger Auftrennung des zu untersuchenden Proteingemisches durch gelchromatographische Methoden auf Polyacrylamidgelen durchführen (7). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau sowohl nach vorheriger Trennung der Proteine durch isoelektrische Fokussierung als auch durch Polyacrylamid - Diskgelelektrophorese für die Aktivitätsbestimmung der Superoxiddismutase angewandt.

2.3.3.3.1. Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau nach vorheriger isoelektrischer Fokussierung (7)

Das Proteingemisch wird in einem pH-Gradientengel aufgetrennt, und die Einzelkomponenten werden an der Stelle fokussiert, die ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt (Nettoladung $\pm$ Null) entspricht.
Dieses Verfahren zeichnet sich durch große Trennschärfe aus und ermöglicht unter anderem die Darstellung von Isoenzymen. Anschließend wird die Superoxiddismutase-Aktivität nach dem oben beschriebenen Prinzip auf dem Gel lokalisiert.

2.3.3.3.1.1. Durchführung

Die vorbereiteten Proben werden auf PAG-Gelplatten (LKB Ampholine PAG-plates) nach der Methode von (53) isoelektrisch fokussiert. Verwendet werden Gelplatten im pH-Bereich 3,5 bis 9,5 bzw. 4,0 bis 6,5. Der pH-Bereich 3,5 bis 9,5 wurde zur Untersuchung von Säuleneluaten und Reinigungsschritten im Rahmen der Enzymisolierung eingesetzt. Der pH-Bereich 4,0 bis 6,5 diente aufgrund seiner höheren Auflösung im Bereich der isoelektrischen Punkte bereits bekannter Cu/Zn Superoxiddismutasen aus anderen Geweben zur Isoenzymanalyse der in dieser Arbeit durchgeführten Enzympräparationen.

2.3.3.3.1.2. Elektrophoresebedingungen für die isoelektrische Fokussierung

pH-Bereich	pH 3,5 - 9,5	pH 4,0 - 6,5
Elektrophoresedauer (min)	90	150
Kühltemperatur (°C)	10	10
maximale Spannung (V)	1500	2000
maximale Stromstärke (mA)	50	25
Leistung (W)	30	25
Anodenlösung	1 M H_3PO_4	0,1 M Glutaminsäure in 0,5 M H_3PO_4
Kathodenlösung	1 M NaOH	0,1 M Beta-Alanin
aufgetr. Probenvolumen (max)	20 µl	20 µl
aufgetr. Proteinmenge je Probe	10 µg	10 µg

Unmittelbar nach Abschluß der isoelektrischen Fokussierung wird die Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau zur Identifizierung der Superoxiddismutase auf den Gelen durchgeführt.

2.3.3.3.1.3. Lösungen

Lösung (1) 1,0 g NBT in 500 ml 0,036 M KPO_4- Puffer, pH 7,8, gelöst.

Lösung (2) 10 mg Riboflavin + 3 ml TEMED in 1000 ml 0,036 M KPO_4 - Puffer, pH 7,8, gelöst.

Lösung (3) Konservierungslösung: 100 ml reines Äthanol + 32 ml Eisessig, ad 400 ml H_2O, + 40 ml Glycerin.

Die Gele werden zunächst lichtgeschützt in Färbeschalen mit Lösung (1) 20 min lang inkubiert. Es folgt - ebenfalls im Dunkeln - eine 15minütige Inkubation mit Lösung(2). Daraufhin werden die Gele auf einer mit Alufolie bespannten Platte für 20 min einer Bestrahlung mit UV-Licht ausgesetzt, welche in einer Belichtungskammer mit zwei 16 W UV-Lampen erfolgt.
Die gefärbten Gele werden 1 Std. lang in Lösung (3) konserviert und staubfrei getrocknet.
Die achromatischen Banden auf den blaugefärbten Gelen entsprechen den Isoenzymen der Superoxiddismutase. In Referenzgelen wird der pH-Wert mit Hilfe einer speziellen Flachbettelektrode in 1 cm-Abständen auf dem Gel bestimmt.

2.3.3.3.2. Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau nach vorheriger Diskgelelektrophorese (18, 71)

Proteinproben werden auf die obere Gelschicht (Sammelgel) der Diskgele aufgetragen und in dieser zunächst konzentriert. Die Einzelkomponenten treten anschließend als scharfe Banden in die untere Gelschicht (Trenngel) ein. In dieser werden sie nach elektrophoretischer Beweglichkeit und Größe im elektrischen Feld aufgetrennt.

2.3.3.3.2.1. Lösungen zur Herstellung der Gele (39, 58)

Trenngel

Lösung 1

48,0 ml 1 N HCl
36,3 g Tris pH 8,9
0,23 ml Temed
ad 100 ml H_2O dest.

Lösung 2

28,0 g Acrylamid
0,735 g bis -Acrylamid
ad 100 ml H_2O dest.

Lösung 3

0,14 g Persulfat
ad 100 ml H_2O dest.

Sammelgel

Lösung 4

48,0 ml 1 N HCl
5,98 g Tris pH 6,7
0,46 ml Temed
ad 100 ml H_2O dest.

Lösung 5

10,0 g Acrylamid
2,5 g bis - Acrylamid
ad 100 ml H_2O dest.

Lösung 6

4,0 mg Riboflavin
ad 100 ml H_2O dest.

Lösung 7

40,0 g Saccharose
ad 100 ml H_2O dest.

Mischungsverhältnis der Lösungen zur Gelherstellung:

Sammelgel		**Trenngel (7,5% Acrylamid pH 8,9)**	
1 Teil	Lösung 4	1 Teil	Lösung 1
2 Teile	Lösung 5	2 Teile	Lösung 2
1 Teil	Lösung 6	1 Teil	H_2O dest.
4 Teile	Lösung 7	4 Teile	Lösung 3

Elektrodenpuffer:

6,0 g Tris
28,8 g Glycin pH 8,3
ad 1000 ml H_2O dest.

zum Gebrauch 1:10 verdünnen.

2.3.3.3.2.2. Gelherstellung

Für jeden Elektrophoreselauf werden 14 Polyacrylamidgele gemäß der Methode von Davis (18) in speziellen Glasröhrchen (Innendurchmesser 4 mm, Länge 10 cm) hergestellt. Nach dem vorsichtigen Absaugen des Wassers von den polymerisierten Gelen werden die Röhrchen in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Durch schnelles Drehen beim Aufsetzen des Kammeroberteiles läßt sich verhindern, daß der Kontakt der Gele zum Elektrodenpuffer durch Luftblasen gestört wird.

2.3.3.3.2.3. Probenvorbereitung

Von einer mit wässeriger Glycerinlösung (50%) verdünnten Probenlösung (11500g-Überstände der Zell- oder Gewebshomogenate, gereinigte Endstufen der Enzymisolierungen), der eine Spur Bromphenolblau als Frontindikator zugesetzt wird, werden Volumina von 50 µl bis 100 µl aufgetragen. Das jeweilige Volumen entspricht einer Proteinmenge von 1 µg bzw. 5 µg.

2.3.3.3.2.4. Durchführung der Elektrophorese

Vor dem Auftragen der Proben wird eine Präelektrophorese von 1 Stunde Dauer durchgeführt. Bei einer Stromstärke von 1,5 mA pro Gel liegt die Spannung zwischen 120 V und 180 V. Die Proben werden - den Elektrodenpuffer unterschichtend - auf die Gele aufgetragen. Die Dichteerhöhung durch den Glycerinzusatz verhindert ein Aufwirbeln der Probenlösung beim Auftragen. Die Elektrophorese erfolgt mit einer Stromstärke von 2 mA pro Gel und einer Spannung von 220 - 250 V bei einer Kühltemperatur von 12°C und wird nach 2 Stunden beendet. Bis zu diesem Zeitpunkt ist die Bromphenolblaubande bis ca. 0,5 - 1 cm oberhalb des anodischen Gelendes gewandert.
Die Gele werden vorsichtig mit einer Mikroliter-Spritze aus den Röhrchen herausgelöst; anschließend wird die Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau als Aktivitätstest der Superoxiddismutase auf den Gelen durchgeführt. Die Inkubation der Gele in den vorbereiteten Lösungen erfolgt nach dem unter 2.3.3.3.1.3. beschriebenen Verfahren.
Bis zur photographischen Dokumentation lassen sich die Gele nach der UV-Bestrahlung in 0,036 M KPO_4- Puffer, pH 7,8 aufbewahren.

2.3.4. Enzymaktivitätsbestimmung der Superoxiddismutase - direkte Methode

Im Rahmen dieser Arbeit kam als direkte Methode zur Aktivitätsbestimmung der Superoxiddismutasen die Pulsradiolyse zur Anwendung. Mit diesem Verfahren kann die Dismutasereaktion der Superoxidradikale ($\cdot O_2^-$) direkt verfolgt werden, indem die Kinetik der Lichtabsorption von $\cdot O_2^-$-Ionen direkt gemessen wird. Auf diese Weise lassen sich auch Reaktionskonstanten und Reaktionsordnungen ermitteln.

2.3.4.1. Pulsradiolyse (8, 25, 51)

Bei der Pulsradiolyse werden in sauerstoffgesättigter und formiathaltiger Lösung (0,01 - 0,1 M Formiat) durch Elektronenpulse von 100 ns Dauer mit einer Energie von 1,8 MeV und einer Dosis zwischen 0,15 und 5 krad/Puls praktisch nur $\cdot O_2^-$-Ionen in einer Konzentration zwischen 1 µM und 35 µM produziert. Sauerstoffgesättigte, formiathaltige, wässrige Lösungen stellen eine hervorragende Quelle für Superoxidanionen dar. Die Lösungen für die Pulsradiolyse werden mit dreifach destilliertem und pyrrolisiertem Wasser ohne Pufferzusatz hergestellt.
Zur Einstellung des pH-Wertes wird 1N NaOH bzw. 1N $HClO_4$ verwendet. Bei der hier benutzten Febetron Pulsradiolyseanlage des Strahlenbiologischen Instituts der Universität München diente in der Detektoranlage eine Osram XBO 450 W Xenonlampe als Lichtquelle.
Über Spiegelsysteme, Monochromator und Photomultiplier wird der Lichtstrahl in den Meßraum geleitet und gemessen.
Die Bestimmung der Reaktionskonstanten und -ordnungen erfolgt durch computergestützte Auswertung der Abklingkinetiken.

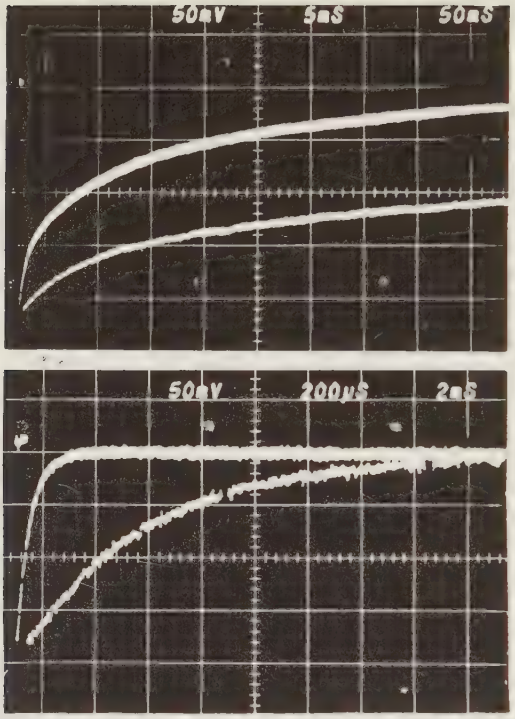


Abb. 10: Abklingkurven des Zerfalls pulsradiolytisch erzeugten Superoxids (51). Die bei 250 nm gemessenen zeitabhängigen Absorptionsänderungen wurden auf dem Schirm eines Oszilloskops dargestellt und mit einer Polaroidkamera aufgenommen. Am oberen Rand der Bilder sind die eingestellten Bereiche des Oszilloskops für Empfindlichkeit und Zeitablenkung pro Rastereinheit (cm) eingeblendet.
Oberes Bild: Spontandismutation, 400 msec nach Reaktionsbeginn sind immer noch Superoxidradikale zu beobachten. Unteres Bild: Die durch Cu/Zn Superoxiddismutase ($9{,}1 \times 10^{-6}$ M) katalysierte Dismutationsreaktion ist bereits nach 2 msec beendet.

2.3.5. Spezielle analytische Methoden

Für die proteinchemische Analyse der Reinigungsschritte und Endprodukte der Superoxiddismutase-Isolierungsarbeiten wurden die bereits beschriebenen Methoden der isoelektrischen Fokussierung und der Diskgelelektrophorese auf Polyacrylamidgelen angewandt.

2.3.5.1. Auftrennung der Proteine durch isoelektrische Fokussierung (53)

Prinzip und Durchführung der isoelektrischen Fokussierung sind bereits unter 2.3.3.3.1. beschrieben. Nach Beendigung der Fokussierung wird eine Hälfte des Gels für den qualitativen Nachweis der Superoxiddismutase-Aktivität (s. 2.3.3.3.1.2./3.) eingesetzt, die andere Gel-Hälfte mit identischen Proben zur Darstellung der Proteine weiterverarbeitet. Die nach dem jeweiligen Trennprinzip aufgetrennten Einzelproteine werden mit einer standardisierten Färbemethode auf dem Gel als Proteinbanden sichtbar gemacht. Parallel dazu wird auf demselben Gel die Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau als indirekter Nachweis der Superoxiddismutase-Aktivität durchgeführt. Damit wird eine Zuordnung der Superoxiddismutase-aktiven Proteinbanden möglich. Ebenso kann eine Identifizierung nicht aktiver Proteinanteile der gereinigten Enzympräparationen erfolgen.

Für die Proteinfärbung werden folgende Lösungen verwendet:

1) Fixierlösung:	57,5 g Trichloressigsäure 17,25 g Sulfosalicylsäure in 500,0 ml H_2O dest.
2) Entfärbelösung:	500,0 ml Äthanol 160,0 ml Eisessig ad 2000,0 ml mit H_2O dest.
3) Färbelösung:	0,46 g Coomassie Brill. Blue R250 in 400,0 ml Entfärbelösung
4) Konservierungs-lösung:	40,0 ml Glycerin zu 400,0 ml Entfärbelösung

Das Gel wird 30 min lang in Fixierlösung aufbewahrt und anschließend für 5 min in Entfärbelösung gelegt.
Auf eine 10 minütige Inkubation in erhitzter Färbelösung (60°C Wasserbad) folgt eine ca. 24 Stunden dauernde Entfärbung des Gels durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung.
Nach Einwirken der Konservierungslösung (1 Stunde) wird das Gel staubfrei getrocknet und durch eine Folie geschützt bis zur Auswertung aufbewahrt.

2.3.5.2. Auftrennung der Proteine durch Diskgelelektrophorese auf Polyacrylamidgelen (18, 71)

Diese bereits für den Nachweis der Superoxiddismutase-Aktivität beschriebene Technik (s. 2.3.3.3.2.) wurde in parallel angesetzten Gelröhrchen für die Proteinfärbung als empfindliches Verfahren der Reinheitsanalyse isolierter Superoxiddismutasen durchgeführt.

Es werden 5 µg Protein pro Probe auf ein Gel aufgetragen. Nach Abschluß der Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine mit filtriertem 0,5 % (w/v) Amidoschwarz in 7% (v/v) Essigsäure für 10 min angefärbt. Die Entfärbung erfolgt mit 7% Essigsäure unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung.

2.3.5.3. Auftrennung der Proteine durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ein hochauflösendes Verfahren zur Darstellung des Proteinmusters der aus den Enzymisolierungen gewonnenen Endprodukte kam mit der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Anwendung (69).

2.3.5.3.1. Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamid-Ampholine-Gelen (1.Dimension)

Die analytische Qualität dieser Technik beruht auf der Auftrennung der Proteine nach zwei voneinander unabhängigen Parametern. Zunächst werden die Proteine in ihrem nativen Zustand gemäß ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt durch eine isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamid-Ampholine-Gelen getrennt (1.Dimension).

2.3.5.3.1.1. Lösungen zur Herstellung der Gele

Lösung 1: 12,0 g Acrylamid
0,32 g Methylenbisacrylamid
ad 50,0 ml H_2O bidest.

Lösung 2: 30,0 mg Ammoniumperoxodisulfat
in 100,0 ml H_2O bidest.

Lösung 3: 40% (v/v) Ampholine pH 4,0 - 6,5

Lösung 4: 0,5 ml Ampholine pH 4,0 - 6,5
1,0 g Saccharose
in 19,0 ml H_2O bidest.

Lösung 5: 0,2 ml TEMED
19,8 ml H_2O bidest.

Elektrodenpuffer:

Anodenlösung: 0,1 % (w/v) Phosphorsäure pH 2,3
Kathodenlösung: 0,1 % (v/v) Äthanolamin pH 11,0

Probenpuffer (50 ml) zur Aufbewahrung der Gele nach der 1. Dimension (IEF):

Tris-HCl-Puffer 1 M pH 6,8	5 ml
SDS 10% (w/v)	25 ml
Glycerol	5 ml
H_2O bidest.	13 ml
Bromphenolblau	2 ml

2.3.5.3.1.2. Gelansatz (9 Röhrchen, Höhe 12 cm; Durchmesser 0,2 cm)

3,0 ml Lösung (1)
8,0 ml Lösung (2)
0,6 ml Lösung (3)

Mischen und 2 min Entgasen

+ 0,8 ml Lösung (5)

12,4 ml Mischung

Jedes Glasröhrchen wird mit dieser Mischung gefüllt (Höhe 10 cm). Durch Überschichten mit H_2O bidest. entsteht eine glatte Geloberfläche. Die Polymerisation der Gele benötigt ca. 30 Minuten. Nach dem Absaugen des überschichteten Wassers werden die Röhrchen an der Unterseite mit einer in Kathodenlösung gespülten Dialysiermembran verschlossen und luftblasenfrei in die mit der Kathodenlösung gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt.

2.3.5.3.1.3. Auftragen der Proben und Durchführung der isoelektrischen Fokussierung

Auf jedes Gel werden 10 µg des nativen gereinigten Proteins im Elutionspuffer des letzten Reinigungsschrittes (Vol. 7µl bis 37µl) aufgetragen. Danach werden je 35 µl Lösung (4) vorsichtig überschichtet. Anschließend wird die obere Kammerhälfte mit der Anodenlösung gefüllt.
Die Fokussierung erfolgt über 15 Std 30 min bei einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 5 mA. Nach Beendigung werden die Gele durch vorsichtiges Umspritzen mit Glycerin aus den Röhrchen gelöst.

Zur Messung des pH-Gradienten wird ein Kontrollgel in 5 mm lange Stücke geschnitten, die in je 2 ml entgastem H_2O dest. gelöst werden; der pH-Wert der Einzelproben wird mit einem pH-Meter bestimmt. Die Probengele werden in mit je 5 ml Probenpuffer gefüllten Reagenzröhrchen bei -10°C eingefroren und bis zur Auftragung auf das Gradientengel (2.Dimension) aufbewahrt.

2.3.5.3.2. Auftrennung der isoelektrisch fokussierten Proteine auf Polyacrylamid-Gradientengel (2.Dimension)

Mittels einer Flachbett-Gradienten-Gelelektrophorese erfolgt in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) eine Auftrennung der Proteine nach dem jeweiligen Molekulargewicht (2.Dimension). Es wird mit Flachgelen gearbeitet, welche einen hyperbolen Polyacrylamid-Gradienten (5% - 22,5%) aufweisen.

2.3.5.3.2.1. Lösungen für die Gradientengele

	5 %	22,5 %
Tris/HCl - Puffer 1 M pH 8,8	37,5 ml	37,5 ml
H_2O bidest.	41,8 ml	18,8 ml
SDS 10 % (w/v)	1,0 ml	1,0 ml
Acrylamid 30 % (w/v)	18,7 ml	-
Acrylamid 60 % (w/v)	-	42,0 ml

Für jeden Ansatz werden pro Gel 20 ml entnommen.
Vor dem Füllen der Gradientenmischkammern werden jeweils
Ammoniumperoxodisulfat 1,5% (w/v) 200 µl
TEMED 10 µl
als Startsubstanzen zur Polymerisation zugegeben.

2.3.5.3.2.2. Lösungen für das Spacergel

Acrylamid 30% - Bisacrylamid 0,8%	1000 µl
SDS 20%	50 µl
Tris/HCl - Puffer 1 M pH 6,8	1250 µl
H_2O bidest.	7600 µl
kurz vor dem Gießen des Gels werden zugegeben:	
Ammoniumperoxodisulfat 10%	100 µl
TEMED	10 µl

2.3.5.3.2.3. Agaroselösung

Zur Herstellung einer Verbindung zwischen dem Diskgel und dem Flachgel dient folgende Agaroselösung:

Agarose	0,5 g
H_2O bidest.	25,0 ml
Tris/HCl - Puffer 1 M pH 6,8	5,0 ml
Glycerol	5,0 ml
kurz aufkochen	
SDS 20 %	12,5 ml
beta-Mercaptoaethanol	2,5 ml

2.3.5.3.2.4. Herstellung des Polyacrylamid-Gradientengels

Zwischen zwei lotrecht eingespannte Gelplatten werden 2 ml 0,1% SDS von unten eingepumpt. Aus einer eisgekühlten Gradienten-Mischkammer wird das Gradientengel - ebenfalls von unten - rasch und kontinuierlich nachgepumpt. Da das Volumen der Mischkammer, welche anfangs die 5%ige Acrylamidlösung enthält, während des Ansaugens der 22,5%igen Acrylamidlösung aus der zweiten Kammer konstant gehalten wird, nimmt der Acrylamidgehalt in dem gegossenen Gel von oben nach unten nach Art eines hyperbolen Gradienten zu.
Die Polymerisation des Gradientengels benötigt etwa 1 - 2 Stunden. Ist diese erfolgt, wird der SDS-Überstand abgegossen und durch 3%iges Spacergel ersetzt. Auf das polymerisierte Spacergel wird ein auf Raumtemperatur gebrachtes Ampholine-Gel der vorherigen isoelektrischen Fokussierung (1.Dimension) aufgelegt. Durch Einspritzen von ca 1 ml kochender Agaroselösung zwischen das Ampholine-Gel und das Spacergel wird ein guter Kontakt - Voraussetzung für eine ungehinderte Diffusion der Proteine in das Spacergel - hergestellt.
An einer Seite des Polyacrylamid Gradientengels werden in eine vorgeformte Tasche 5 µl einer Lösung mit Eichproteinen aufgetragen und mit 50 µl Agaroselösung überschichtet.

2.3.5.3.2.5. Zusammensetzung der Eichproteine:

	Molekulargewicht (Dalton)
Myosin	200 000
beta-Galactosidase	116 500
Phosphorylase B	92 500
Serum - Rinderalbumin	66 200
Katalase	60 000
Ovalbumin (Hühnerei)	45 000
Aldolase	40 000
Chymotrypsinogen	25 000
Myoglobin	17 800
Cytochrom c	12 400

Elektrodenpufferlösungen:

Tray - Puffer (10-fach konzentrierte Stammlösung):

Tris	30 g
Glycin	144 g

ad 1000 ml H_2O bidest.
pH 8,3

Verwendeter Elektroden-Puffer:

Tray - Puffer (Stammlösung)	50 ml
SDS 20%	2,5 ml

ad 500 ml H_2O bidest.

2.3.5.3.2.6. Durchführung der Elektrophorese

Die Elektrophorese erfolgt bei einer konstanten Spannung von 250 V (Stromstärke 30 - 40 mA) während der ersten 45 Minuten bei 20°C (Raumtemperatur), anschließend für 4 Std bei 4°C (Kühlraum).

2.3.5.3.2.7. Färbung der Gradientengele

Lösungen für die Proteinfärbung:

1. Färbelösung:

Coomassie Brilliant Blau		1,25 g (= 0,25%)
Methanol		225 ml (= 45%)
Eisessig		50 ml (= 10%)
H_2O dest.		225 ml

2. Entfärbelösung:

a) starke Entfärbe-lösung:	Methanol	250 ml (= 50%)
	Eisessig	50 ml (= 10%)
	H_2O dest.	200 ml
b) schwache Entfärbe-lösung:	Methanol	25 ml (= 5%)
	Eisessig	50 ml (= 10%)
	H_2O dest.	425 ml

3. Konservierungslösung:

Eisessig	100 ml (= 10%)
Glycerin	30 ml (= 3%)
H_2O dest.	870 ml

Nach Abschluß der Elektrophorese werden die Gelplatten aus der Apparatur entfernt und über 12 Std bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wird ca. 10 Std. mit starker Entfärbelösung, dann ca. 1 Woche lang unter mehrmaligem Wechseln der Lösung mit schwacher Entfärbelösung behandelt.
In der Konservierungslösung werden die Gele bis zur Auswertung aufbewahrt.

2.3.5.3.3. Auswertung

Im Vordergrund des Interesses standen die Proteinmuster der einzelnen isolierten Enzyme. Zur Kontrolle des Molekulargewichts wurde durch semilogarithmische Auftragung des Molekulargewichts (log MW) der Eichproteine gegen ihre jeweilige gemessene Wanderungsstrecke (mm) auf dem Gel für jedes Gel eine Eichgerade aufgestellt.

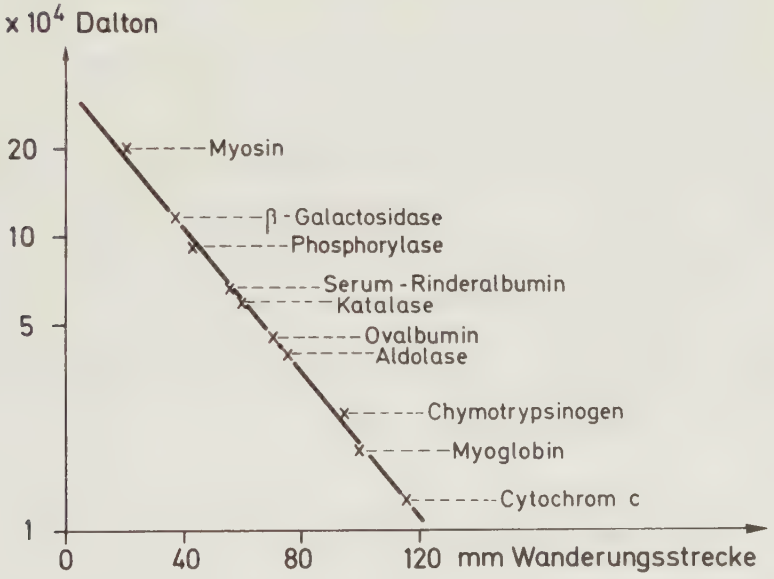


Abb. 11: Protein-Mapping: Eichgerade zur Berechnung des Molekulargewichts gereinigter Cu/Zn Superoxiddismutasen aus ihrer Wanderungsstrecke auf Polyacrylamid-Flachgelen (2.Dimension) nach vorheriger Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung (1.Dimension). Zur Erstellung der Eichgeraden dienten 9 Eichproteine mit bekanntem Molekulargewicht (s. Text).

Abszisse: Wanderungsstrecke der Proteine (mm)
Ordinate: Logarithmus des Molekulargewichts (Dalton x 10^4)
Korrelation: -0,998
Für jedes Gel wurde eine Eichgerade erstellt.

2.3.5.4. Metallgehalt

Zur Analyse der isolierten Proteine mit Superoxiddismutase-Aktivität hinsichtlich ihres Metallgehaltes an Kupfer und Zink diente die Atomabsorptionsspektrophotometrie.

2.3.5.4.1. Prinzip (12)

Die Probelösung wird durch einen Vernebler atomisiert. In einer Flamme (Acetylen/Luft - Brenngas) werden die Metallatome bei ca. 2500°C verdampft. Die Atome des zu messenden Metalls absorbieren bei einer für das Metall charakteristischen Wellenlänge Energie eines monochromatischen Lichtstrahls, der durch eine entsprechende Hohlkathodenentladungslampe produziert wird. Der absorbierte Energiebetrag ist der im optischen Weg anwesenden Anzahl von Atomen proportional.

2.3.5.4.2. Durchführung der Messungen

Der Metallgehalt an Kupfer wurde durch Absorption bei der Wellenlänge 324,7 nm bestimmt. Um einen störenden Einfluß der salzhaltigen Puffer, in denen die Enzyme gelöst waren, auf die Messung auszuschließen, wurden drei Eichkurven im linearen Meßbereich von 10 µg Cu/100 ml bis 200 µg Cu/100 ml aufgestellt. Der Metallgehalt an Zink wurde durch Absorption bei der Wellenlänge 213,9 nm ermittelt. Für einen linearen Meßbereich von

1 µg Zink/100 ml bis 30 µg Zink/100 ml wurden ebenfalls drei Eichkurven aufgestellt.
Die Kupfer- bzw. Zinkstandardlösungen, welche zur Berechnung der jeweiligen Eichkurve dienten, wurden mit Pufferlösungen der gleichen Konzentration hergestellt, in denen auch die jeweiligen zur Metallgehaltsmessung bestimmten Enzyme gelöst waren. Diese wurden zur Messung mit aqua bidest. im Verhältnis 1:5 oder 1:10 verdünnt und so auf einen Metallgehalt eingestellt, der im Bereich der jeweiligen Eichkurve lag. Die Berechnung des Kupfer- und Zinkgehaltes (Mol Cu pro Mol Cu/Zn SOD bzw. Mol Zn pro Mol Cu/Zn SOD) erfolgte auf der Grundlage der durch den molaren Absorptionskoeffizienten (89, 97) ermittelten Proteinmenge. Für die zur Berechnung des Metallgehaltes eingesetzten Molekulargewichte der Superoxiddismutase - Enzyme wurden die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung (siehe 2.3.5.5) und die entsprechenden Molekulargewichtsangaben der Literatur (34, 62) berücksichtigt.

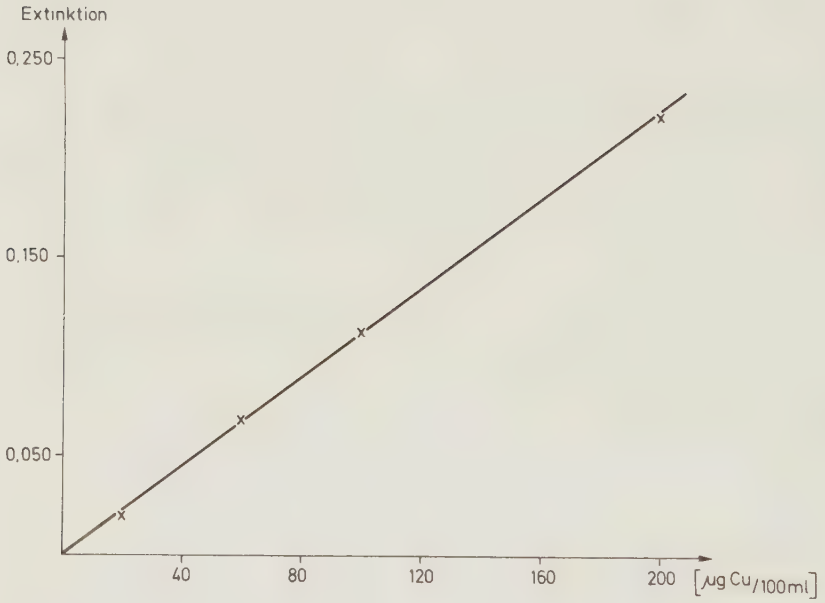


Abb. 12: Cu-Eichgerade für Metallgehaltbestimmung in gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen.
Die Eichgerade wurde aus 4 Verdünnungen einer Kupfer-Standardlösung erstellt (siehe Text).
Abszisse: Konzentration des Kupfers (µg Cu/100 ml)
Ordinate: Δ E 324,7 nm gegen den Lösungspuffer der Proben (Leerwert) gemessen.
Korrelation: -0,998

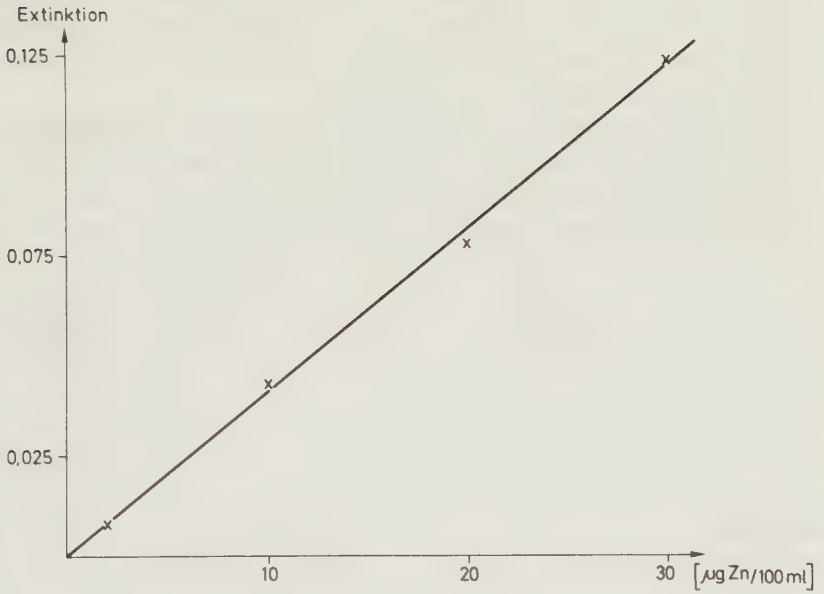


Abb. 13: Zn-Eichgerade für Metallgehaltbestimmung in gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen.
Die Eichgerade wurde aus 4 Verdünnungen einer Zink-Standardlösung erstellt (siehe Text).
Abszisse: Konzentration des Zink (µg Zn/100 ml)
Ordinate: Δ E 213,9 nm gegen den Lösungspuffer der Proben (Leerwert) gemessen.
Korrelation: -0,998

2.3.5.5. Molekulargewicht

Die Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten der isolierten Cu/Zn Superoxiddismutasen wurde durch Polyacrylamid - Diskgelelektrophorese in Anwesenheit des Detergens SDS durchgeführt (58, 90, 94). Die elektrophoretische Beweglichkeit der einzelnen Proteine im Gel ist unter diesen Bedingungen proportional dem jeweiligen Molekulargewicht.
Die Proben wurden vergleichsweise auch mit 0,1% beta-Mercaptoäthanol bei 56°C inkubiert, um durch zusätzliche Reduktion der Disulfidbrücken möglicherweise auftretende Polymere der Untereinheiten in Monomere zu spalten.

2.3.5.5.1. Lösungen

Lösung (1):

Acrylamid	20,0 g
Methylenbisacrylamid	0,52 g
SDS	0,20 g
TEMED	0,15 g
Natriumphosphat-Puffer 0,2 M pH 7,0	50,0 ml
H_2O bidest.	ad 100,0 ml

Lösung (2):

Ammoniumperoxodisulfat	0,15 g
Natriumphosphat-Puffer 0,2 M pH 7,0	50,0 ml
H_2O bidest.	ad 100,0 ml

Probenpuffer a (nicht reduzierend)

SDS	0,80 g
Natriumphosphat-Puffer 0,2 M pH 7,0	5,0 ml
Glycerin	50,0 ml
H_2O bidest.	ad 100,0 ml
Bromphenolblau	25,0 mg

Probenpuffer b (zur Reduktion der Disulfidbrücken)

SDS	0,80 g
Natriumphosphat-Puffer 0,2 M pH 7,0	5,0 ml
Glycerin	50,0 ml
beta-Mercaptoäthanol	0,4 ml
H_2O bidest.	ad 100,0 ml
Bromphenolblau	25,0 mg

Laufpuffer

SDS	2,0 g
Natriumphosphat-Puffer 0,2 M pH 7,0	1000 ml
H_2O bidest.	ad 2000 ml

2.3.5.5.2. Herstellung der Gele

Die Gelröhrchen (Länge 100 mm, ∅ 5 mm) werden am unteren Ende mit Parafilm verschlossen und senkrecht in einen Ständer gestellt (14 Gele pro Elektrophoreselauf). Die Füllung erfolgt in allen Röhrchen bis 1,5 cm unterhalb des oberen Randes gleich hoch mit einer Mischung von 1 Vol. Lösung (1) und 1 Vol. Lösung (2).

Zur Erzielung einer glatten Oberfläche wird die Acrylamidlösung in den Röhrchen vor der Polymerisierung vorsichtig mit H_2O bidest. überschichtet. Die Polymerisationszeit beträgt ungefähr 15 - 20 Minuten.

2.3.5.5.3. Vorbereitung der Proben

Auf ein Gel werden als Probe entweder ein isoliertes Enzym (15 µg Protein), 5 Eichproteine (je 15 µg Protein) oder Enzym und Eichproteine zusammen aufgetragen.
Jede Probe wird sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen angesetzt.

2.3.5.5.4. Eichproteine

	Molekulargewicht (Dalton)
Cytochrom c	12 400
Myoglobin (Pferd)	17 800
Chymotrypsinogen A	25 000
Albumin (Hühnerei)	45 000
Albumin (Rinderserum)	67 000

2.3.5.5.5. Probenansätze

	Probenansatz a (nicht reduzierende Bedingungen)	**Probenansatz b** (reduzierende Bedingungen)
Probenlösung	10 µl - 120 µl	10 µl - 120 µl
Natriumphosphat-Puffer 0,01 M pH 7,0	ad 150 µl	ad 150 µl
Probenpuffer a / b	50 µl	50 µl
gut mischen	200 µl	200 µl
	2 Std Inkubation bei Zimmertemperatur (20 °C)	2 Std Inkubation bei 56 °C

2.3.5.5.6. Elektrophorese

Nach dem Einsetzen der Gelröhrchen in die Elektrophoreseapparatur werden die Probelösungen auf die Gele pipettiert. Nach vorsichtigem Auffüllen mit Laufpuffer wird das Kammeroberteil ebenso wie zuvor das Unterteil mit Laufpuffer gefüllt.
Die Stromstärke beträgt 7 mA pro Gel bei einer Spannung von 40 V, die Laufzeit 4 Std 30 min (20 °C Raumtemperatur). Am Ende der Elektrophorese ist unter diesen Bedingungen die führende Bromphenolblaubande ca. 1,5 cm über dem unteren Gelrand erkennbar.

2.3.5.5.7. Färbung der Gele

1. **Färbelösung:**

Trichloressigsäure	100	g (= 20%)
H_2O bidest.	500	ml
Coomassie Brilliant Blau	1,25	g (= 0,25%)

2. **Entfärbelösung:**

Essigsäure 7%

Nach der Elektrophorese werden die Gele ca. 2 Stunden in Reagenzgläsern der Färbelösung ausgesetzt. Durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung werden die Gele in 48 bis 72 Stunden entfärbt.

2.3.5.5.8. Auswertung (94)

Durch Auftragen der bekannten Molekulargewichte der Eichproteine auf der Ordinate in logarithmischem Maßstab gegen deren Mobilität (Mittelwerte) auf der Abszisse in konventionellem Maßstab wird für jeden Elektrophoreselauf eine Eichgerade sowohl für das reduzierende als auch für das nicht reduzierende System berechnet.
Die Mobilität eines Proteins ist definiert:

$$\frac{\text{Mittlere Wanderungsstrecke eines Proteins}}{\text{Länge des Gels nach Entfärbung}} \times \frac{\text{Länge des Gels vor Färbung}}{\text{Wanderungsstrecke der Bromphenolblaubande}}$$

Das unbekannte Molekulargewicht eines Proteins kann als Funktion der Mobilität an Hand der entsprechenden Eichkurve rechnerisch ermittelt werden.

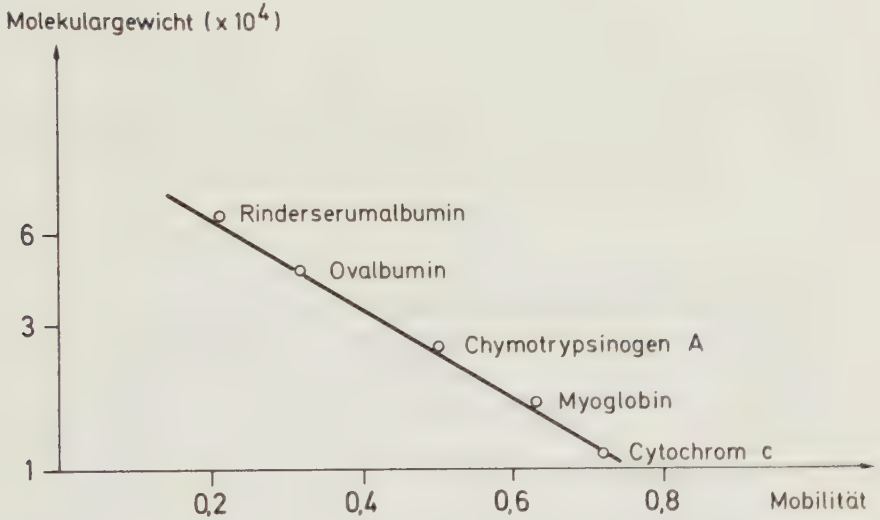


Abb. 14: Eichgerade der SDS-Polyacrylamid-Diskgelelektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen.
Zur Erstellung der Eichgeraden wurden fünf Eichproteine (je 15 µg) auf ein SDS-Rundgel (1 % SDS) aufgetragen: Cytochrom c (12400 Dalton), Myoglobin (17800 Dalton), Chymotrypsinogen (25000 Dalton), Albumin vom Hühnerei (45000 Dalton) und Albumin aus Rinderserum (67000 Dalton).
Elektrophoresebedingungen: Stromstärke 7 mA/Gel, Spannung 50 V
Laufzeit 4 1/2 Stunden
Abszisse: Mobilität, definiert als

$$\frac{\text{mittl. Wanderungsstrecke eines Proteins}}{\text{Länge des Gels nach Entfärben}} \times \frac{\text{Länge des Gels vor Färbung}}{\text{Wanderungsstrecke der Bromphenolblaubande}}$$

Ordinate: Logarithmus des Molekulargewichts (Dalton x 10^4).
Bei jedem Elektrophoreselauf wurde je eine Eichgerade unter reduzierenden (mit 0,1 % Mercaptoäthanol) und unter nicht reduzierenden Bedingungen (ohne Mercaptoäthanol) erstellt.
Korrelation der Eichgerade: -0,998

3. ERGEBNISSE

3.1. Isolierung von Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz und Milz von Rindern mit serologisch nachgewiesenem Antikörper gegen das bovine Leukämie-Virus (BLV)

Die praktische Durchführung und die Ergebnisse der Isolierungsarbeiten aus Rindermilz und BLV-positiver Rindermilz werden im folgenden vergleichend dargestellt. Alle Reinigungsschritte wurden - wenn nicht anders angegeben - im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

3.1.1. Gewinnung des Ausgangsmaterials

Die Rindermilzen (ca. 1400 g) wurden im Städtischen Schlachthof München unmittelbar nach Entnahme in Empfang genommen und unter Eiskühlung nach 1 - 2 Stunden weiterverarbeitet.
Zwei Milzen (ca. 1550 g) von Rindern mit serologisch nachgewiesenem Antikörper gegen das bovine Leukämie-Virus (BLV-positiv) wurden ebenfalls schlachtfrisch von der Sanitätsabteilung zur Verfügung gestellt. Im Gegensatz zur normalen Rindermilz war die Schnittfläche der Milzen von den BLV-positiven Rindern bereits makroskopisch auffällig. Es fand sich eine miliare, homogen über die gesamte Schnittfläche verteilte Aussaat von kleinen, weißen Knötchen, die auch auf anderen Schnittflächen erkennbar war.

3.1.2. Histologischer Befund

Für die histologische Begutachtung der Rindermilzen wurde frisches Gewebsmaterial entnommen (Prof.Dr.Löhrs, Pathologisches Institut der Universität München).

Normale Rindermilz:
Milz mit kräftig entwickelten Trabekeln. In der roten Pulpa zahlreiche, dicht gelegene Siderophagen. Die Lymphfollikel zum Teil etwas hyperplastisch mit vergrößerten Keimzentren. Struktur erhalten.

BLV-positive Rindermilz:
Überall erhaltene Milzstruktur mit kräftigem Trabekelgerüst. In der roten Pulpa eine deutliche Siderose. Die Lymphfollikel durchwegs gering bis mäßig hyperplastisch mit teilweise vergrößerten Keimzentren und zum Teil etwas verbreiterten Außenzonen. Keine Zellatypien.

Zusammenfassende Beurteilung:
In allen untersuchten Rindermilzen ergibt sich kein morphologischer Anhalt für eine lymphatische oder myeloische Systemerkrankung. Es liegt eine deutliche Siderose und eine gering- bis mäßiggradige, follikuläre, lymphatische Hyperplasie vor.

3.1.3. Gewebsaufarbeitung und Gewinnung von Rohhomogenat bzw. Homogenat-Überstand

Die präparative Aufarbeitung des Milzgewebes war für die normale und die BLV-positive Milz identisch.
Nach Waschen der Milzen mit kalter (4 °C) physiologischer Kochsalzlösung zur Entfernung der Blutreste wurde die beim Rind sehr derbe Milzkapsel mit einem Skalpell abpräpariert. Das lymphatische Gewebe wurde aus dem Stroma herausgeschabt und bei -70 °C eingefroren.
Je 200 g Feuchtgewicht des aufgetauten, gepoolten Milzgewebes wurden bei 4 °C mit 300 ml H_2O bidest. aufgeschwemmt und in einem Star-Mix bei 5000 U/min für 3 Minuten homogenisiert. Insgesamt wurden bei der Normalmilz 3700 ml eines rotbraunen, trüben Rohhomogenats von breiiger Konsistenz bzw. 4500 ml eines gleichartigen Rohhomogenats bei der BLV-positiven Milz gewonnen. Das Rohhomogenat wurde 30 Minuten lang bei 4 °C und 12000 RPM (13500 g) abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge RC-5, GSA Rotor) und der dunkelrote klare Homogenat-Überstand (Normalmilz: Vol. 1950 ml; BLV-positive Milz: Vol. 2200 ml) in ein 5-Liter-Becherglas gefüllt.

3.1.4. Hämoglobinfällung nach der Tsuchihashi Methode (92)

Der Homogenatüberstand wurde mit 0,25 Vol.-Teilen Äthanol und 0,15 Vol.-Teilen Chloroform versetzt und etwa 20 Minuten lang bei 4 °C gerührt. Die ockerfarbene, breiige Suspension (Normalmilz: Vol. 2700 ml; BLV-positive Milz: Vol. 3050 ml) wurde 15 min lang bei 4 °C mit 12000 RPM (13500 g) abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge RC-5, GSA-Rotor). Hierbei bildeten sich eine untere, unter dem Zentrifugationsniederschlag eingeschlossene, chloroformreiche Schicht sowie eine obere Äthanol-Phase. Der cognacfarbene, klare Äthanol-Überstand, die obere Phase, wurde in einem 3-Liter-Becherglas gesammelt. Man erhielt so 2000 ml für die Normalmilzpräparation und 2300 ml für die Präparation von BLV-positiver Milz.

3.1.5. Hämoglobinbestimmung

Im Homogenat-Überstand vor Hämoglobinfällung und im Äthanolüberstand nach Hämoglobinfällung wurde der Hämoglobingehalt bestimmt (siehe Mat. und Methoden 2.3.1.4.). Die Werte wurden rechnerisch über eine Eichgerade ermittelt.

	RINDER-Normalmilz		BLV-positive RINDER-Milz	
	Hb-Konz. (g/100 ml)	Gesamt-Hb (g)	Hb-Konz. (g/100 ml)	Gesamt-Hb (g)
Homogenat-Überstand	1,6	32	1,5	33
Äthanol-Überstand	0	0	0	0

3.1.6. Salzfällung

Zum Äthanolüberstand wurde bei Zimmertemperatur (20°C) festes Di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) in einer Konzentration von 300 mg/ml zugegeben und ca. 30 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Salzes gerührt. Die Lösung wurde im Anschluß daran zur Phasentrennung in einen 5 Liter fassenden Scheidetrichter gefüllt und 90 Minuten stehengelassen.

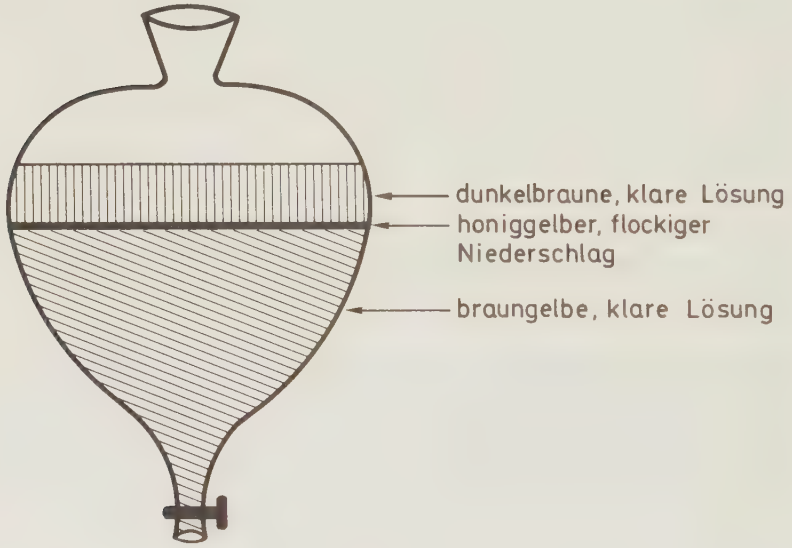


Abb. 14a: Erklärung siehe Text

Die obere Äthanol-reiche Phase mit dem flockigen Niederschlag an der Phasengrenze wurde von der unteren Chloroform-/Salzphase

abgetrennt, gesammelt und auf 4 °C abgekühlt. Nach 30 min Zentrifugation bei 4 °C und 12000 RPM/13500 g (Sorvall-Zentrifuge RC-5, GSA-Rotor) wurde der klare Überstand (Normalmilz: 650 ml; BLV-positive Milz: 700 ml) vom hellbraunen Niederschlag mit der wieder darunter eingeschlossenen Chloroformblase vorsichtig abgegossen und vereinigt.

3.1.7. Acetonfällung

Der Überstand aus der Salzfällung wurde mit zwei Vol.-Teilen eiskaltem (-20 °C) Aceton vermischt und nach kurzem Rühren ca. 40 min bei 4°C stehengelassen. Nach Abgießen des wasserklaren Überstandes wurde der gelb-braune, flockige Niederschlag 15 min lang bei 4°C und 12000 RPM/13500 g (Sorvall-Zentrifuge RC-5, GSA-Rotor) abzentrifugiert. Dieser Niederschlag wurde nach Abgießen des Überstandes bei beiden Trennungsgängen in jeweils 100 ml kaltem (4 °C) Natriumacetat-Puffer (0,015 M, pH 5,0; Leitfähigkeit 0,7 mmho) resuspendiert. Die so erhaltene dunkelbraune Lösung wurde in einen Dialyseschlauch gefüllt und bei 4 °C gegen 5 x 5 Liter (= 20-faches Volumen) des Puffers, der zur Resuspendierung des Niederschlages nach der Acetonfällung verwendet worden war, je acht Stunden (insgesamt 40 Stunden) dialysiert, um Aceton- und Chloroformrückstände zu beseitigen. Nach Beendigung der Dialyse war ein weiß-flockiger Niederschlag im Dialyseschlauch (Ausschlußgrenze 20000 Dalton) ausgefallen. Das Dialysat (Normalmilz: Vol. 165 ml, BLV-positive Milz: Vol. 175 ml) wurde 15 min lang bei 4 °C und 12000 RPM/13500 g abzentrifugiert und der Überstand bei 4 °C aufbewahrt.

3.1.8. Kationenaustauschchromatographie im diskontinuierlichen Verfahren (Batch-Verfahren)

12 g trockene Carboxymethylcellulose (Sephadex CM 50) wurden mit etwa 700 ml Dialysepuffer (0,015 M, pH 5,0; Leitfähigkeit 0,7 mmho) bei 4°C gequollen und unter mehrfachem Pufferwechsel 24 Stunden äquilibriert.
In ca. 250 ml dieser äquilibrierten Suspension wurde das Dialysat vorsichtig eingerührt und für 2 1/2 Stunden unter Rühren bei 4 °C stehengelassen. Auf diese Weise wurde eine möglichst quantitative Bindung der bei pH 5,0 bindungsfähigen Proteine an CM 50 erreicht. Zur Entfernung nicht gebundener Proteine wurde das Äquilibrat auf einer Nutsche (12 cm ∅) so lange mit 0,015 M NaAc-Puffer gewaschen, bis die Absorption der Waschlösung bei $A_{280\ nm}$ kleiner als 0,015 war. Der Protein-beladene Austauscher wurde in eine für das Volumen von 250 ml geeignete Säule (Länge = 70 cm, ∅ = 26 mm) eingefüllt und ca. 12 Stunden mit fünffachem Säulenvolumen (1,3 l) an 0,065 M NaAc-Puffer (pH 5,0; Leitfähigkeit 2,8 mmho) äquilibriert. Bei dieser Ionenstärke erfolgte keine meßbare Proteinablösung. Anschließend wurde mit einem linearen Na-Acetat Gradienten von 0,065 M (pH 5,0; Leitfähigkeit 2,8 mmho) bis 1,0 M (pH 5,0; Leitfähigkeit 29 mmho) eluiert. Die Flußrate wurde mittels einer peristaltischen Pumpe konstant auf 75 ml/Stunde gehalten. Die Extinktion der Eluat-Einzelfraktionen (Vol. 8 ml) wurde bei $A_{254\ nm}$ und $A_{280\ nm}$ fortlaufend gemessen und graphisch registriert (LKB Ultrorac 7000 mit Uvicord 2089 UV-Absorptiometer). Während der Gradienten-Elution schrumpfte das Säulenvolumen aufgrund der steigenden Ionenstärke auf ca. 1/4 des Ausgangsvolumens.

Abb. 15 (A)

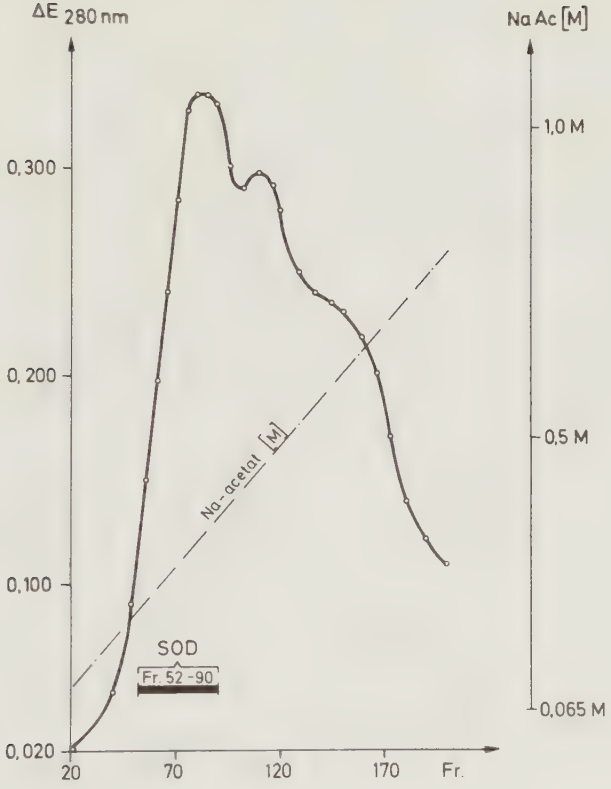

ΔE 280 nm
Na Ac [M]
1,0 M
0,5 M
0,065 M
0,300
0,200
0,100
0,020
Na-acetat [M]
SOD
Fr. 52 - 90
20
70
120
170
Fr.

Abb. 15 (B)

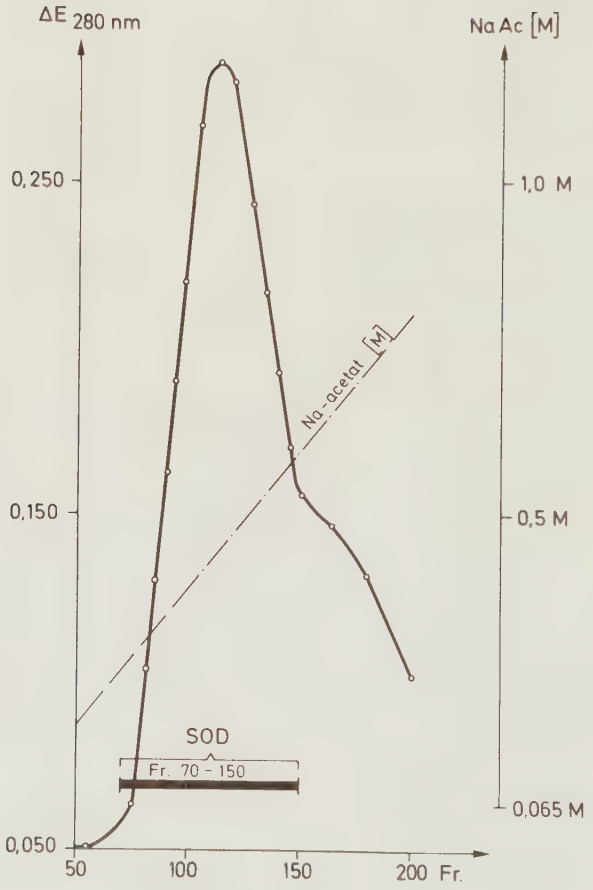


Abb. 15 (A) und (B):
Elutionsdiagramme der mit 0,065 M Natriumacetat-Puffer (pH 5,0; Leitfähigkeit 2,8 mmho) äquilibrierten CM 50-Säule von normaler Rindermilz (A) und BLV-positiver Rindermilz (B). Elution durch linearen Natriumacetatpuffer-Gradienten (0,065 M - 1,0 M; pH 5,0). Die Einzelfraktionen (8 ml) wurden auf ihren Proteingehalt ($A_{280\ nm}$) und ihre Superoxiddismutase-Aktivität (SOD) untersucht (siehe Mat. und Methoden 2.3.3.3.).

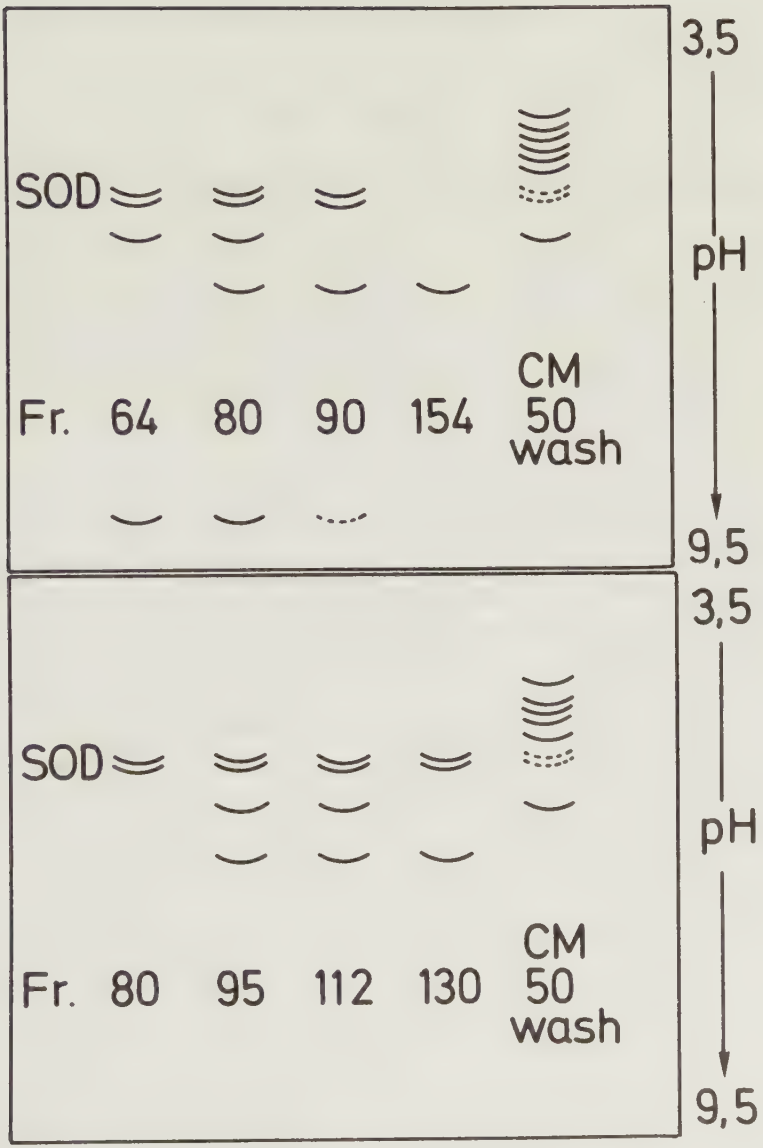


Abb. 16 (A) oberes Bild und (B) unteres Bild: Text s. Seite 76

Abb. 16: Isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamidgel (PAG-plate, pH 3,5 - 9,5) der angegebenen Eluatfraktionen von normaler Rindermilz (A) und BLV-positiver Rindermilz (B) nach CM 50-Chromatographie.
Elektrophoresedauer 1,5 Std. mit konstanter Leistung von 30 Watt.
Anodenlösung: 1 M H_3PO_4; Kathodenlösung: 1 M NaOH

Ein Teil des Gels wurde im Anschluß an die Elektrophorese fixiert und mit Coomassie Brilliant Blue zur Proteindarstellung gefärbt. Der andere Teil wurde zum Nachweis von Superoxiddismutase-Aktivität verwendet, welche mittels Hemmung der photochemischen Reduktion von Nitrotetrazoliumblau (NBT) dargestellt wurde. Zu diesem Zwecke wurde das Gel zuerst für 20 min in $2{,}45 \times 10^{-3}$M NBT und anschließend 15 min in Lösung (0,028 M Tetramethyläthylendiamin, $2{,}8 \times 10^{-3}$M Riboflavin, 0,036 M KPO_4-Puffer, pH 7,8) inkubiert. Nach der darauf folgenden 15-minütigen Bestrahlung mit UV-Licht konnte die Superoxiddismutase-Aktivität in Form von achromatischen Banden auf dem Gel lokalisiert werden (siehe Mat. und Methoden 2.3.3.3.).

Bei der Rindermilz ließ sich in den Fraktionen 52 - 90, bei der BLV-positiven Rindermilz in den Fraktionen 70 - 150 Superoxiddismutase-Aktivität nachweisen. Zur näheren Analyse der Fremdproteine wurde nach isoelektrischer Fokussierung das Proteinmuster untersucht.
Die gepoolten Fraktionen 52 - 90 (gesamt ca. 300 ml) der normalen Rindermilz und die gepoolten Fraktionen 70 - 150 (gesamt ca. 650 ml) der BLV-positiven Rindermilz wurden durch eine Amicon YM 10 Ultrafiltrationsmembran (Ausschlußgrenze 10000 Dalton) auf ein Volumen von 10 ml bzw. 12 ml eingeengt. Das Ultrafiltrat hatte in beiden Fällen eine goldgelbe Farbe.

3.1.9. Gelfiltrationschromatographie

100 g trockenes Sephadex G-75 wurden in 1700 ml Puffer (0,1 M KCl, 0,005 M K_2HPO_4, 1 x 10^{-5} M EDTA, 0,1 % beta-Mercaptoäthanol, pH 7,8; Leitfähigkeit 13 mmho) ca. 40 Stunden bei Raumtemperatur unter mehrfachem Pufferwechsel gequollen und äquilibriert.
Anschließend wurde 20 min lang entgast, eine dem Volumen entsprechende Chromatographiesäule (Länge 100 cm, ∅ 50 mm) damit gefüllt und mit ungefähr drei Säulenvolumina (5 l) obigen Puffers nachgespült (hydrostatischer Druck: 100 cm Wassersäule).
Die bei beiden Isolierungen im Verhältnis 2 Teile Puffer : 1 Teil Ultrafiltrat auf ca. 30 ml verdünnte Probe (Ultrafiltrat nach CM 50) wurde vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette auf die glatte Geloberfläche aufgetragen und mit obigem Puffer eluiert. Unter konstant gehaltener Durchflußrate von 75 ml/Stunde wurden 250 Einzelfraktionen zu je 8 ml (gesamt ca. 2000 ml) bei der Rindermilz bzw. 200 Einzelfraktionen zu je 8 ml (gesamt ca. 1600 ml) bei der BLV-positiven Rindermilz aufgefangen und der Elutionsverlauf bei $A_{254\ nm}$ und $A_{280\ nm}$ verfolgt.

Abb. 17 (A)

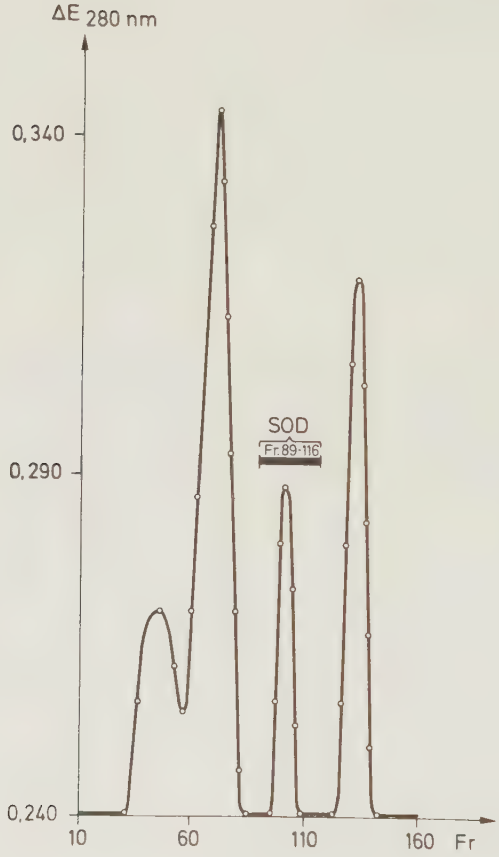


Abb. 17 (B)

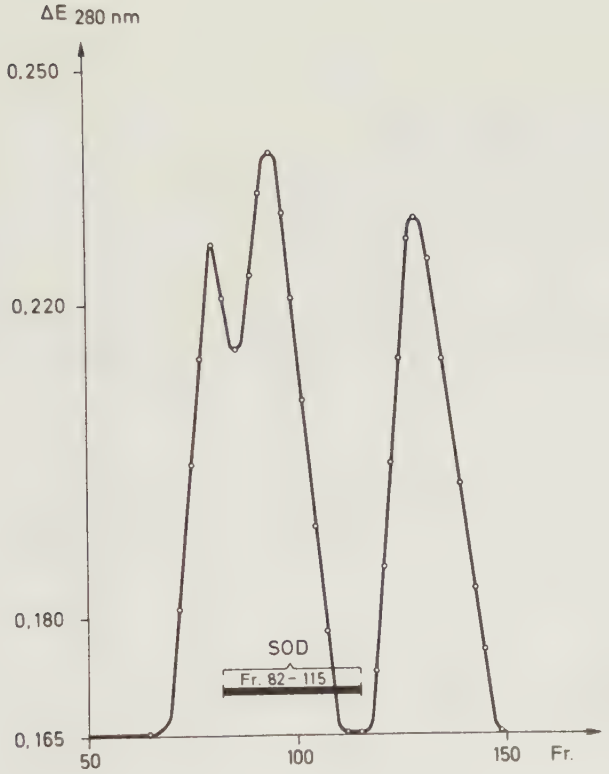


Abb. 17 (A) und (B):
Elutionsdiagramme der Sephadex G 75-Chromatographie von normaler Rindermilz (A) und BLV-positiver Rindermilz (B) nach Elution mit Puffer (0,1 M KCl, 0,005 M K_2HPO_4, 1 x 10^{-5} M EDTA, 0,1 % beta-Mercaptoäthanol, pH 7,8; Leitfähigkeit 13 mmho). Die Einzelfraktionen (8 ml) wurden auf Proteingehalt ($A_{280\ nm}$) und Superoxiddismutase-Aktivität (SOD) untersucht (siehe Mat. und Methoden 2.3.3.3.).

Das Proteinmuster nach isoelektrischer Fokussierung der verschiedenen G-75 Eluat-Peakfraktionen ist in Abb. 18 (A) - oberes Bild - und 18 (B) - unteres Bild - dargestellt (Text s. Seite 81).

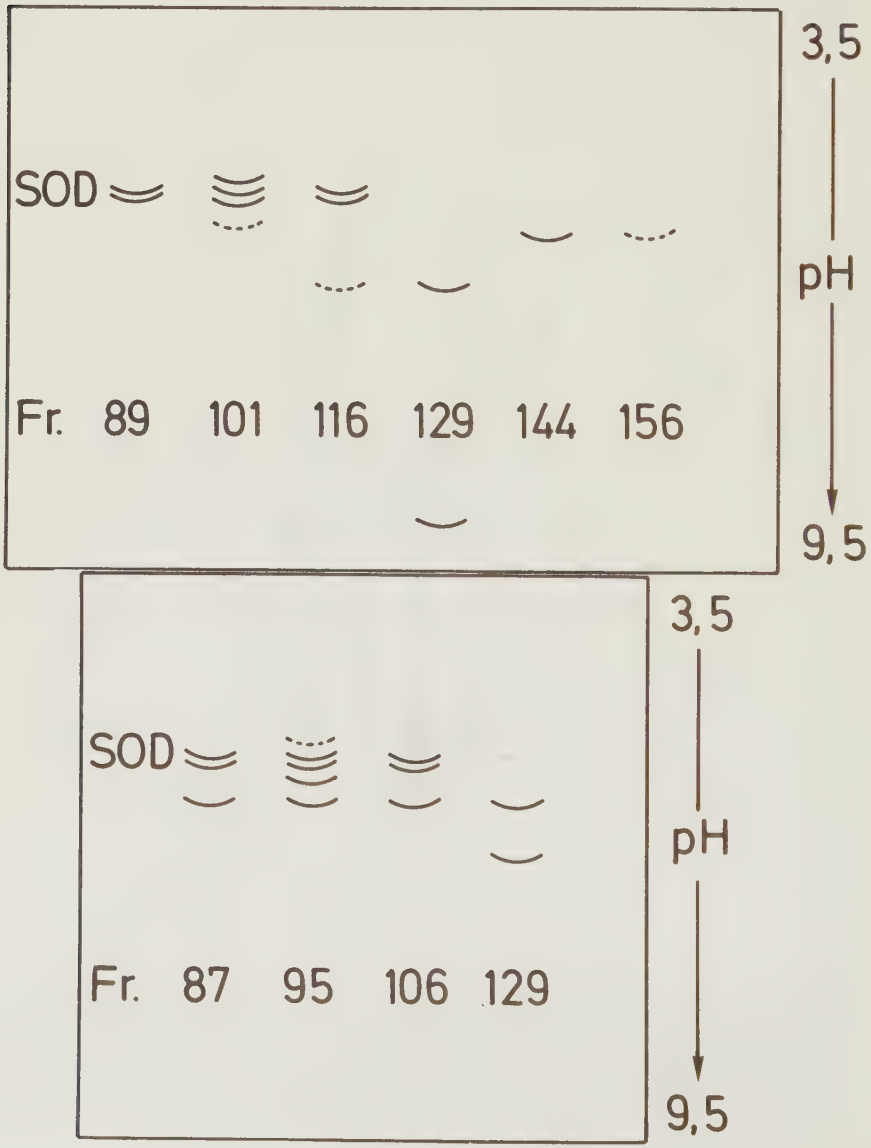


Abb. 18 (A) und (B):
Isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamidgel (PAG-plate, pH 3,5 - 9,5) der angegebenen Eluatfraktionen nach Sephadex G 75-Säulenchromatographie von normaler Rindermilz (A) und BLV-positiver Rindermilz (B) (Meth. siehe Legende zu Abb. 16).

Der jeweils letzte Proteingipfel bei der normalen Rindermilz (A) (Fr. 144) und bei der BLV-positiven Rindermilz (B) (Fr. 129) enthält ein Fremdprotein mit geringem Molekulargewicht, welches sich durch den Molekularsiebeffekt gut abtrennen läßt.
Die gepoolten Fraktionen mit nachweisbarer Superoxiddismutase-Aktivität - bei der Normalmilzisolierung waren dies die Fraktionen 89 - 116 (210 ml), bei der Enzymisolierung aus BLV-positiver Rindermilz die Fraktionen 82 - 115 (gesamt 250 ml) - wurden über eine Amicon YM 10-Membran ultrafiltriert und auf ein Volumen von 11 ml bzw. 12 ml eingeengt. Beide Ultrafiltrate waren farblos.

3.1.10. Anionenaustauschchromatographie

Ein Teil des Ultrafiltrates nach G-75 (normale Rindermilz: 5 ml; BLV-positive Rindermilz: 4 ml) wurde mit 40 ml 5 x 10^{-3} M KPO_4-Puffer (pH 7,0; Leitfähigkeit 1,10 mmho) durch eine Amicon YM 10-Membran diafiltriert, um die Puffereigenschaften dem folgenden Chromatographielauf anzupassen.
5 g Sephadex DEAE A50 wurden in 70 ml 0,1 M KPO_4-Puffer (pH 7,0; Leitfähigkeit 2,9 mmho) gequollen und über 12 Std bei Zimmertemperatur äquilibriert.
5 g Sephadex G-25 (Coarse) wurden in 25 ml 5 x 10^{-3} M KPO_4-Puffer (pH 7,2; Leitfähigkeit 1,07 mmho) gequollen und ebenso über 12 Stunden bei Zimmertemperatur äquilibriert.

In eine kleine Chromatographiesäule (Länge 15 cm ,Ø 9 mm) wurden erst ca. 1 - 2 ml gequollenes Sephadex G-25 gegeben, um ein Trockenlaufen der Säule im Ausflußbereich zu verhindern. Darüber wurden vorsichtig ca. 3 ml der DEAE A50-Suspension geschichtet. Die so gestopfte Säule wurde mit ca. 8 Säulenvolumina (30 ml) 5 x 10^{-3} M KPO_4-Puffer (pH 7,2; Leitfähigkeit 1,07 mmho) gespült (hydrostatischer Druck: 20 cm Wassersäule). Nach Durchlauf von etwa 25 ml blieb die gemessene Absorption ($A_{280\ nm}$) des auslaufenden Puffers konstant; der Austauscher quoll durch die Abnahme der Ionenstärke auf ein Volumen von ca. 5 ml.

Die diafiltrierten Proben (normale Rindermilz und BLV-positive Rindermilz je 4 ml) wurden vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette aufgetragen und anschließend die Säule bei konstant gehaltener Flußrate von 36 ml/Stunde unter gleichzeitiger Messung der Extinktion von $A_{254\ nm}$ und $A_{280\ nm}$ in Einzelfraktionen von je 1,2 ml eluiert. Dazu wurde ein linearer KPO_4-Puffer-Gradient von 0,005 M (pH 7,2; Leitfähigkeit 1,07 mmho) - 0,1 M (pH 7,2; Leitfähigkeit 2,8 mmho) unter Zuhilfenahme eines Gradientenmischers angelegt.

Abb. 19 (A)

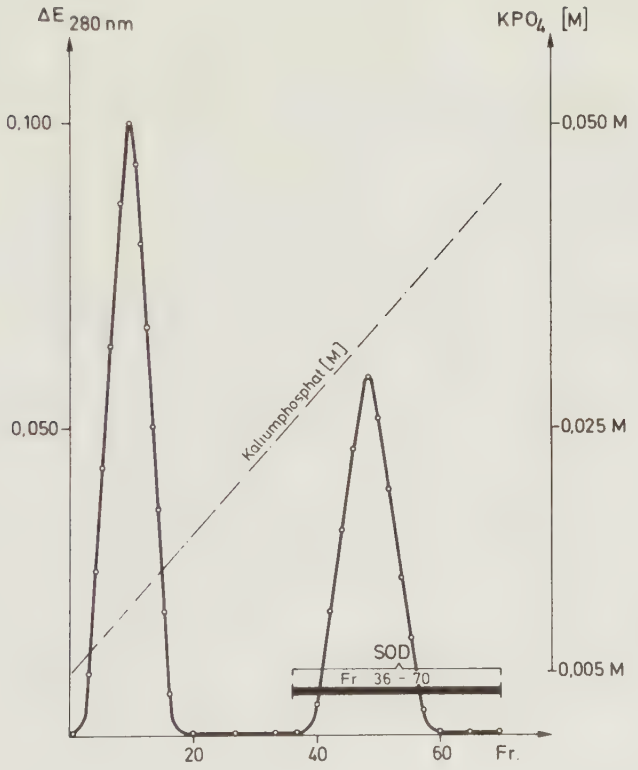

ΔE 280 nm
KPO4 [M]
0,100
0,050
0,050 M
0,025 M
0,005 M
Kaliumphosphat [M]
SOD
Fr 36 - 70
20
40
60
Fr.

Abb. 19 (B)

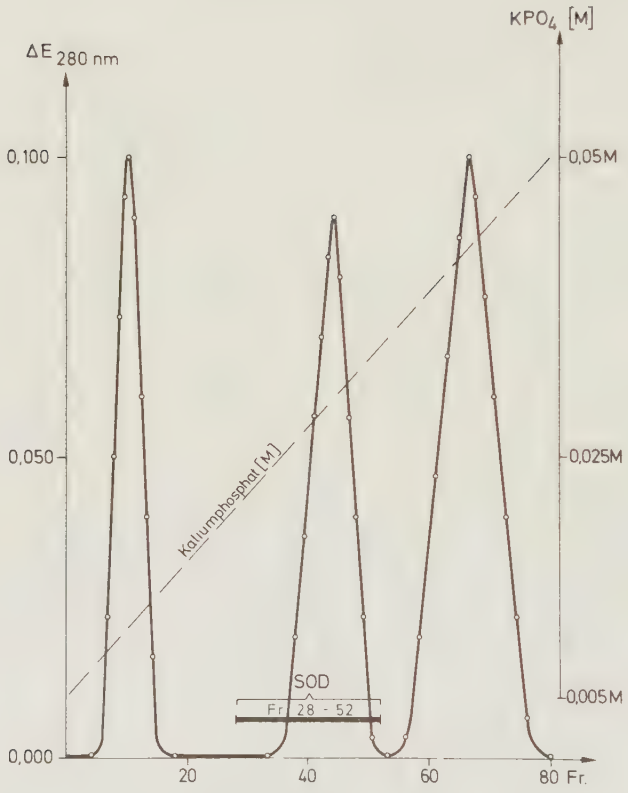


Abb. 19 (A) und 19 (B):
Elutionsdiagramme der mit 0,005 M KPO_4-Puffer (pH 7,2; Leitfähigkeit 1,07 mmho) äquilibrierten DEAE A 50-Säule von normaler Rindermilz (A) und BLV-positiver Rindermilz (B).
Elution durch linearen KPO_4-Puffergradienten (0,005 M - 0,1 M, pH 7,2). Die Einzelfraktionen wurden auf Proteingehalt ($A_{280\ nm}$) und Superoxiddismutase-Aktivität (SOD) untersucht (siehe Mat. und Methoden 2.3.3.3.).

Eine isoelektrische Fokussierung der Proteinpeak-Fraktionen in den Elutionsdiagrammen nach DEAE A50-Chromatographie (Fr. 3-12 und 36-70 bei der normalen Rindermilz sowie die Fr. 3-20, 28-52 und 53-80 bei der BLV-positiven Rindermilz), wurde jeweils durchgeführt.

Abb. 20 (A)

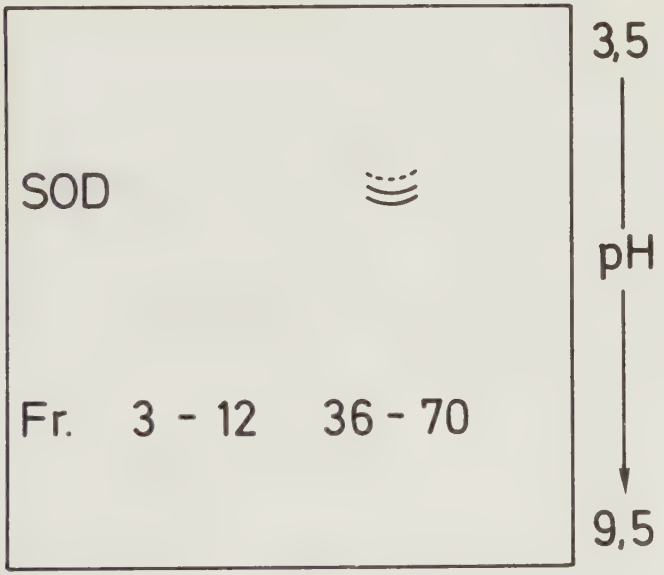


Abb 20 (A): Text s. Seite 86

Abb. 20 (B)

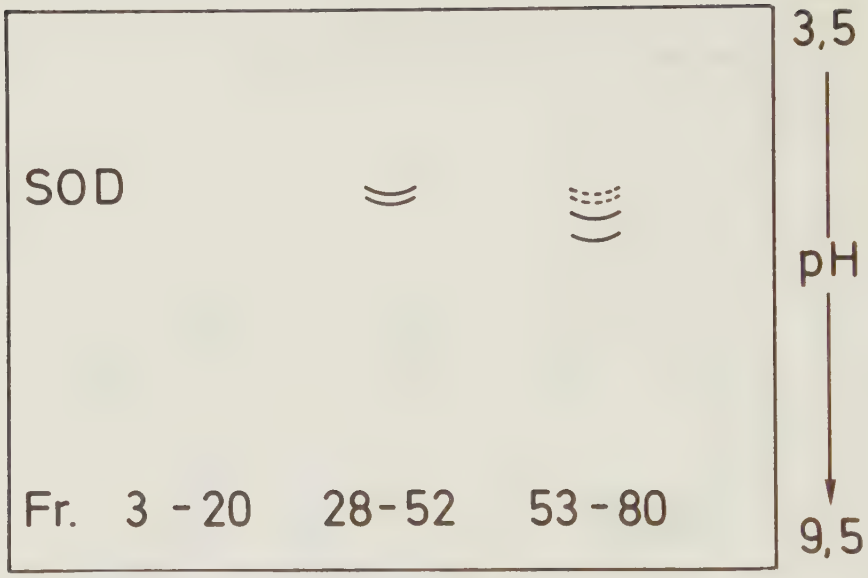


Abb. 20 (A) und (B): Isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamidgel (PAG-plate, pH 3,5 - 9,5); aufgetragen wurden die angegebenen Eluatfraktionen von normaler Rindermilz (A) und BLV-positiver Rindermilz (B) nach DEAE A50-Chromatographie (Methode siehe Legende zu Abb.16).

Während der erste Absorptions-Peak bei beiden DEAE A 50 Elutionen (A: Fr 3-12, B: 3-20) auf der isoelektrischen Fokussierung einer proteinfreien Salzfront entsprach, zeigte der jeweils folgende Peak zwei Proteinbanden für das Superoxiddismutase-Enzym. Bei der BLV-positiven Rindermilz ließ sich noch ein zweiter Protein-Gipfel eluieren, der neben einer geringen Superoxiddismutase-Aktivität zwei - im Vergleich zu den Superoxiddismutase-aktiven Banden - kathodische Fremdproteine enthielt.
Die Fraktionen 36 - 70 (normale Rindermilz) bzw. 28 - 52 (BLV-positive Rindermilz) wurden gepoolt, über eine Amicon YM 10-Membran auf jeweils 5 ml ultrafiltriert, mit cirka

12 ml 5 x 10^{-3} M KPO_4-Puffer (pH 7,2; Leitfähigkeit 1,07 mmho) durch eine Amicon YM 10-Membran diafiltriert, anschließend durch ein steriles Filter (Porengröße <0,2 µm; Acrodisc^R, Fa. Gelman) gepreßt und bei 4 °C steril aufbewahrt (normale Rindermilz: 3,0 ml, BLV- positive Rindermilz: 3,0 ml).

3.1.11. Reinigungstabellen

Die einzelnen Stufen der Präparation von Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz und BLV-positiver Rindermilz sind in den folgenden beiden Tabellen A und B getrennt dargestellt.
Bei der dargestellten Präparation des Enzyms aus normaler Rindermilz (Tabelle A) wurden 4 mg der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutase mit einer spezifischen Aktivität von 4020 Units/mg Protein bei einer Gesamtausbeute von 3,5 % erhalten. Beim Vergleich dieses Endprodukts mit dem Reinigungsschritt nach G-75 Chromatographie, der trotz relativ hoher Ausbeute (21,5%) eine Proteinfraktion mit einer spezifischen Aktivität von 3155 U/mg liefert, führt die DEAE-Chromatographie unter hohem Ausbeute-Verlust zu einer weiteren Reinigung des Enzyms um den Faktor 1,3. Gegenüber dem Rohhomogenat (spez. Aktivität 5,4 U/mg) wurde im gereinigten Endprodukt (spez. Aktivität 4020 U/mg) eine 744-fache Anreicherung erzielt.

Im Vergleich wurden bei 676-facher Anreicherung aus BLV-positiver Rindermilz (Tabelle B) 2,7 mg der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutase mit einer spezifischen Aktivität von 3900 U/mg Protein (Gesamtausbeute 1,9%) erhalten. Obwohl bei dieser Enzympräparation nach G-75-Chromatographie die spezifische Aktivität relativ hoch ist (2194 U/mg) wird durch den anschließenden DEAE-Chromatographieschritt bei großem Ausbeuteverlust - wie bei der Präparation des Enzyms aus normaler Rindermilz - die Cu/Zn Superoxiddismutase um den Faktor 1,8 weiter gereinigt.

Reinigungstabelle A: Präparation von Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz:

Reinigungs-schritt	Vol. (ml)	Proteinkonz. (mg/ml)	Gesamt Protein (g)	Aktivität (U/ml)	Gesamt Aktiv. (U)	Spezif.Aktiv. (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungs-faktor
Rohhomogenat-Überstand	1950	46,7	91,1	252	491000	5,4	100	1
Äthanol-phase	650	6,8	4,4	454	295000	66,5	60	12,3
Dialysat	165	10,7	1,8	1491	246000	139	50	25,7
nach CM50-Chromato-graphie	10	12,8	0,128	12384	124000	968	25	179
nach G75 Chromato-graphie	10	3,33	0,033	10506	105000	3155	21,5	584
nach DEAE-A50 Chromato-graphie	3	1,43	0,004	5750	17250	4020	3,5	744

Reinigungstabelle B: Präparation von Cu/Zn Superoxiddismutase aus BLV-positiver Rindermilz:

Reinigungs-schritt	Vol. (ml)	Proteinkonz. (mg/ml)	Gesamt Protein (g)	Aktivität (U/ml)	Gesamt Aktiv. (U)	Spezif.Aktiv. (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungs-faktor
Rohhomogenat-Überstand	2200	45,0	99,1	263	579000	5,8	100	1
Äthanol-phase	1020	8,4	8,5	453	462000	54,3	80	9,4
Dialysat	190	10,0	1,9	1174	223000	117	38,6	20,2
nach CM50-Chromato-graphie	12	8,5	0,1	---	---	---	---	---
nach G75 Chromato-graphie	12	4,2	0,050	9214	110500	2194	19,2	439
nach DEAE-A50 Chromato-graphie	3,5	0,79	0,027	3087	10800	3903	1,9	676

3.1.12. Reinigungsgel

Zur Übersicht der schrittweisen Anreicherung der beiden Cu/Zn Superoxiddismutasen aus normaler Rindermilz und BLV-positiver Rindermilz während des Trennungsgangs dient Abb. 21.

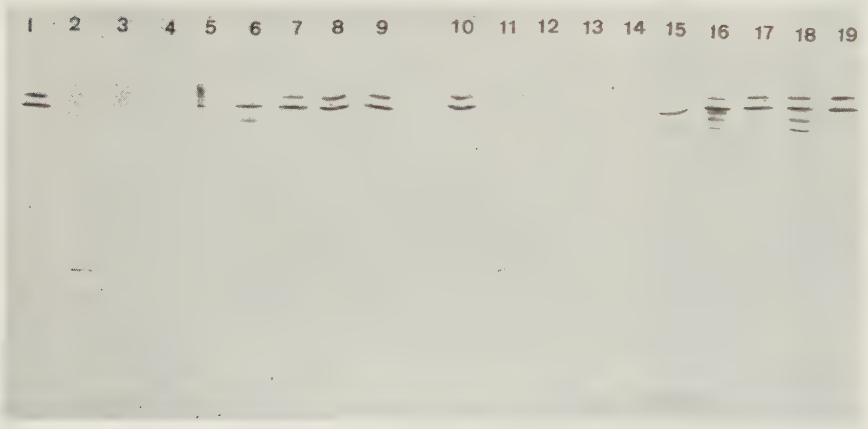


Abb. 21: Proteinauftrennung von Proben der einzelnen Reinigungsschritte von Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz (Proben 2 - 8) und BLV-positiver Rindermilz (Proben 11 - 18) mittels isoelektrischer Fokussierung (PAG-plate, pH 3,5 - 9,5). Zusätzlich wurde gereinigte Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindererythrocyten (Fa. Diagn. Data, Mountain View, California, USA) als Eichprotein (Proben 1, 9, 10, 19) eingesetzt. Die bei jedem Reinigungsschritt jeweils eingesetzte Proteinmenge betrug 10 µg (siehe Mat. und Methoden 2.3.5.1.).

(s. 3.1.8.) Bedingungen nicht an einen Kationenaustauscher aus Carboxymethyl - Cellulose (Sephadex CM 50) binden ließ. Daher wurde nach Gelfiltration des Dialysats über Sephadex G - 75 und Ultrafiltration eine diskontinuierliche Chromatographie an Diäthylaminoäthyl-Cellulose (Sephadex DEAE A 50, Anionenaustauscher) angeschlossen, wobei nach Wegwaschen von ungebundenem Protein das Endprodukt bei höherer Salzkonzentration eluiert wurde.
Dieses Endprodukt wurde nach erneuter Ultrafiltration über Sephadex G25 entsalzt.
Alle hier aufgeführten Reinigungsschritte erfolgten - wenn nicht anders angegeben - bei einer Kühltemperatur von 4 °C.

3.2.1. Hämolyse

Frisch hergestellte Erythrocytenkonzentrate von Blutspendern (n = 7) mit einem Gesamtvolumen von 2000 ml wurden mit dem gleichen Volumen 4 °C kalter physiologischer Kochsalzlösung in einem Becherglas auf 4000 ml verdünnt.
Die Zellzählung dieser Suspension in einer Neubauer - Zählkammer ergab eine Zellkonzentration von 3,1 x 10^6 Zellen/µl.
Die Hämoglobinbestimmung in dieser Suspension (s. Mat. und Methoden: 2.3.1.4.) ergab eine Hämoglobinkonzentration von 13,0 g/100 ml.
Nach einer 20 minütigen Zentrifugation dieser Zellsuspension ohne Bremse mit 3700 RPM (1200 g) in der vorgekühlten Zentrifuge (Sorvall-Zentrifuge RC-5, GSA-Rotor) wurde der Überstand vorsichtig abgekippt. Der Zellniederschlag wurde mit Aqua bidest. wieder auf ein Volumen von 4 l aufgefüllt, eine halbe Stunde lang in einem Becherglas gerührt und zur vollständigen Hämolyse 16 Std. stehengelassen. Das Hämolysat war dunkelrot und klar.

3.2.2. Hämoglobinfällung nach der Tsuchihashi - Methode (92)

Das Hämolysat wurde mit 0,25 Vol.-Teilen Äthanol und 0,15 Vol.-Teilen Chloroform versetzt und 40 min lang gerührt. Die rostbraune breiige Suspension (Vol: 5600 ml) wurde 20 min lang mit 12000 RPM (13000 g) in der vorgekühlten Zentrifuge (Sorvall-Zentrifuge RC-5, GSA-Rotor) abzentrifugiert. Hierbei bildeten sich eine untere, unter dem massiven, rostroten Zentrifugationsniederschlag eingeschlossene, klare, chloroformreiche Schicht und eine obere, ebenfalls klare, äthanolreiche Phase. Die obere, äthanolreiche Phase (Vol: 3500 ml) wurde in einem Becherglas gesammelt. Die erneute Hämoglobinbestimmung in diesem Überstand zeigte, daß das Hämoglobin durch die vorhergehende Fällung quantitativ entfernt worden war.

3.2.3. Salzfällung

Zum Äthanolüberstand wurde bei Zimmertemperatur (20 °C) festes Di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) in einer Konzentration von 300 mg/ml zugegeben und 45 min bis zur vollständigen Lösung des Salzes gerührt. Die Lösung wurde zur Phasentrennung in einen 5 Liter fassenden Scheidetrichter gegeben und eine halbe Stunde bis zur Bildung zweier scharf getrennter Phasen stehengelassen. Die obere, honiggelbe, trübe, äthanolreiche Phase (Vol: 1650 ml) wurde abgetrennt, auf 4 °C abgekühlt und 20 min lang mit 12000 RPM (13000 g) ohne Bremse abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge RC-5, GSA-Rotor). Die untere, chloroformreiche Phase wurde verworfen.
Der gelb-grüne Überstand nach dem Zentrifugieren wurde vom Niederschlag und der darunter eingeschlossenen Chloroformschicht vorsichtig abgegossen, gefiltert und in einem Becherglas gesammelt. Das Gesamtvolumen dieses Überstandes betrug 1500 ml.

3.2.4. Acetonfällung

Der äthanolreiche, die Cu/Zn Superoxiddismutase enthaltende Überstand aus der Kaliumphosphat-Salzfällung wurde mit zwei Vol.-Teilen eiskalten Acetons (-20 °C, Vol: 3000 ml) vermischt, kurz gerührt und für 30 min bei 4 °C stehengelassen. Danach waren ca.150 ml heller, flockiger, gelb-grüner Niederschlag ausgefallen, der 25 min lang ohne Bremse mit 12000 RPM (13000 g) abzentrifugiert wurde (Sorvall-Zentrifuge RC-5, GSA-Rotor).

3.2.5. Kationenaustauschchromatographie im diskontinuierlichen Verfahren (Batch-Verfahren)

In drei Isolierungsversuchen wurde jeweils an die Acetonfällung eine Kationenaustauschchromatographie an Carboxymethylcellulose (Sephadex CM 50) im diskontinuierlichen Batch-Verfahren angeschlossen.

Hierzu wurde jeweils der gesamte Niederschlag nach Acetonfällung in ca. 150 ml 0,015 M Natriumacetat-Puffer (pH 5,0; Leitfähigkeit 0,73 mmho) gelöst und nach 40-stündiger Dialyse gegen insgesamt 15 Liter Lösungspuffer in 120 g äquilibriertes Sephadex CM 50 (Natriumacetat-Puffer, 0,015 M, pH 5,0; Leitfähigkeit 0,7 mmho) eingerührt.
Nach dem Batchen wurde der Austauscher in eine geeignete Säule (Länge 70 cm, Ø 26 mm) gefüllt und mit 2000 ml 0,015 M NaAc-Puffer (pH 5,0; Leitfähigkeit 0,73 mmho) weiter äquilibriert.
Die Elution der Säule erfolgte mit einem linearen Na-Acetat Puffer-Gradienten von 0,015 - 0,065 M (pH 5,0; Leitfähigkeit 0,73 - 2,8 mmho). Dabei ließ sich kein Protein eluieren (Messung bei $A_{280\ nm}$ und $A_{254\ nm}$ der 200 Einzelfraktionen, 8,5 ml). Ein daraufhin angelegter zweiter NaAc-Puffer-Gradient von 0,065 - 1,0 M (pH 5,0; Leitfähigkeit, 2,8 - 29 mmho) führte wiederum zu keiner meßbaren Proteinelution.

Im Überstand (Vol: 1460 ml) nach CM 50-Chromatographie (Batch-Verfahren) wurde mittels Cytochrom c-Reduktionshemmtest die Superoxiddismutase-Gesamtaktivität bestimmt und mit der Gesamtaktivität des Dialysates (Vol. 170 ml) vor dem Batch-Verfahren verglichen.

Tabelle:

Reinigungsschritt	Vol. (ml)	SOD (U/ml)	Aktivität (U)
Dialysat	170	2150	365 500 ($\pm$ 12000)
Ges.-Überstand nach CM 50 (Batch-Verfahren)	1460	238	348 000 ($\pm$ 12000)

Die Superoxiddismutase-Gesamtaktivität war in beiden Lösungen vergleichbar hoch. Somit war keine Bindung der Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten an CM 50 unter den angegebenen Bedingungen erfolgt. Dieser Befund ließ sich in drei verschiedenen Isolierungsversuchen reproduzieren. Aus diesem Grunde wurde die Kationenaustauschchromatographie an CM 50 bei der hier beschriebenen Isolierung nicht durchgeführt, sondern nach Lösen des Niederschlages im Anschluß an die Acetonfällung und nach ausreichender Dialyse eine Gelfiltrationschromatographie angeschlossen.

3.2.6. Dialyse

Nach Abkippen des Überstandes der Acetonfällung wurde der gelbgrüne Zentrifugationsniederschlag mit 150 ml Puffer (0,1 M KCl, 0,005 M K_2HPO_4, 1 x 10^{-5} M EDTA, pH 7,8; Leitfähigkeit 12,3 mmho) gelöst. Die gelb-grüne, klare Lösung wurde anschließend bei 4 °C gegen 3 x 5 Liter (= 10faches Volumen) des gleichen Puffers, der zuvor zum Lösen des Niederschlages nach Acetonfällung gedient hatte, über je 14 Std. (gesamt 42 Std.) dialysiert.
Während der Dialyse fiel kein Protein aus; die Lösung blieb klar und gelb-grün (Vol.: 180 ml). Das Dialysat wurde über eine Amicon YM10 Ultrafiltrationsmembran (Ausschlußgrenze 10000 Dalton) auf 15 ml eingeengt und hatte nach der Ultrafiltration eine intensiv hellgrüne Farbe.

3.2.7. Gelfiltrationschromatographie

100 g trockenes Sephadex G-75 wurden in 1700 ml Puffer (0,1 M KCl, 0,005 M K_2HPO_4, 1 x 10^{-5} M EDTA, pH 7,8; Leitfähigkeit 12,3 mmho) ca. 40 Stunden bei Raumtemperatur unter mehrfachem Pufferwechsel gequollen und äquilibriert.
Anschließend wurde 20 min lang entgast, eine dem Volumen entsprechende Chromatographiesäule (Länge 100 cm, ∅ 50 mm) damit gefüllt und mit ungefähr drei Säulenvolumina (5 l) obigen Puffers nachgespült (hydrostatischer Druck: 100 cm Wassersäule).

Das Ultrafiltrat vom Dialysat (Vol: 15 ml) wurde auf die Geloberfläche aufgetragen und mit Puffer (0,1 M KCl, 0,005 M K_2HPO_4, 1 x 10^{-5} M EDTA, pH 7,8; Leitfähigkeit 12,3 mmho) eluiert. Das Eluat wurde unter konstant gehaltener Durchflußrate von 110 ml/Std. in 200 Einzelfraktionen zu je 8,5 ml aufgefangen. Die Extinktion der Eluat-Einzelfraktionen wurde bei $A_{254\ nm}$ und $A_{280\ nm}$ fortlaufend gemessen und graphisch verfolgt (LKB Ultrorac 7000 mit LKB 2089 Uvicord III UV-Absorptiometer).

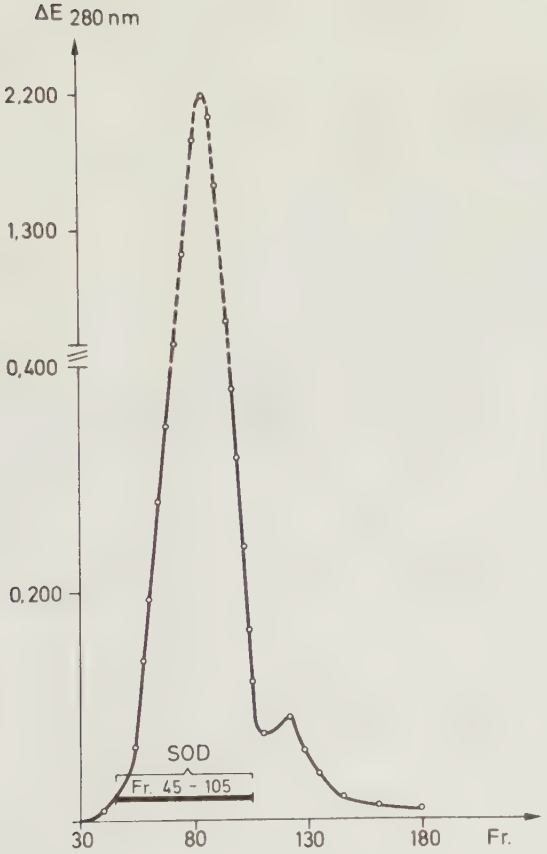


Abb. 22: Elutionsdiagramm der Sephadex G 75 Chromatographie von normalen Human-Erythrocyten nach Elution mit Puffer ($0,1$ M KCl, $0,005$ M K_2HPO_4, 1×10^{-5} M EDTA, pH 7,8; Leitfähigkeit 12,3 mmho). Die Einzelfraktionen (8,5 ml) wurden auf Proteingehalt ($A_{280\ nm}$) und Superoxiddismutase-Aktivität (SOD) untersucht (siehe Mat. und Methoden 2.3.4.2.1.).

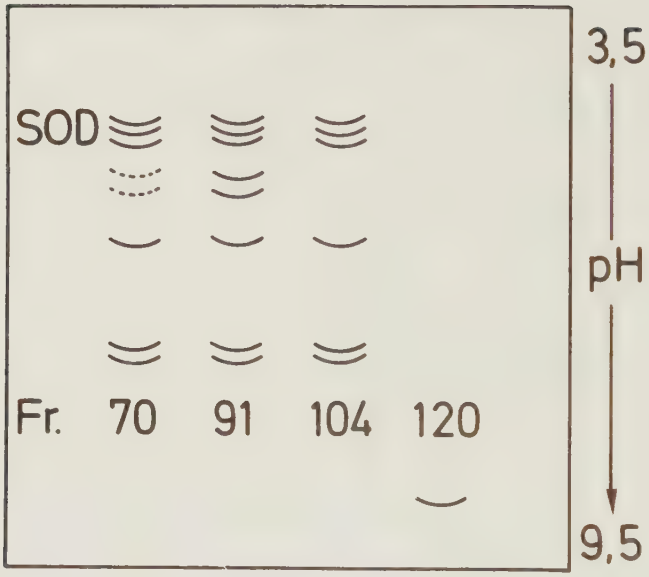


Abb. 23: Isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamidgel (PAG-plate, pH 3,5 - 9,5) der angegebenen Eluatfraktionen von normalen Human-Erythrocyten nach DEAE A 50 Chromatographie (Methode siehe Legende zu Abb. 16).

Die Hauptfraktion (Fr. 45 - 105) weist neben den Fremdproteinen drei Superoxiddismutase-aktive Banden auf. Der flache Proteingipfel (Fr. 120) enthält ein kathodisches Fremdprotein von relativ niedrigem Molekulargewicht, welches sich durch den Molekularsiebeffekt größtenteils von der Hauptfraktion abtrennen läßt.

Die Superoxiddismutase-aktiven Fraktionen 45 - 105 (Vol: 500 ml) wurden gepoolt und mit einer Amicon YM 10 Ultrafiltrationsmembran auf 10 ml eingeengt. Das Ultrafiltrat war hellgrün und klar.

3.2.8. Anionenaustauschchromatographie

10 g Austauscher Sephadex DEAE A 50 wurden in 400 ml 0,1 M KPO_4 - Puffer (pH 7,0; Leitfähigkeit 16,5 mmho) aufgequollen und unter mehrfachem Pufferwechsel 18 Std. bei Raumtemperatur äquilibriert.

Der vorgequollene Austauscher wurde auf einer Nutsche mit 4 l 0,005 M KPO_4 - Puffer (pH 7,2; Leitfähigkeit 1,1 mmho) gewaschen und quoll dabei auf Grund der geringeren Ionenstärke des Waschpuffers auf ca. das doppelte Volumen auf.

250 ml des so vorbereiteten DEAE A 50 Austauschers wurden in eine geeignete Chromatographiesäule (Länge 70 cm, ∅ 26 mm) eingefüllt und mit weiteren 2 l 0,005 M KPO_4 - Puffer (pH 7,2; Leitfähigkeit 1,1 mmho) äquilibriert. Dabei war ein hydrostatischer Druck von 70 cm Wassersäule wirksam.

Auf die Geloberfläche wurde das Ultrafiltrat (10 ml) der gepoolten Fraktionen 45 - 105 vom Eluat der Gelfiltrationschromatographie, welches mit 0,005 M KPO_4 - Puffer (pH 7,2; Leitfähigkeit 1,1 mmho) auf 50 ml verdünnt worden war, vorsichtig mit einer Pasteurpipette aufgetragen. Um nicht-gebundenes Protein zu eluieren, wurde die Säule im Anschluß an den Probenauftrag mit weiteren 500 ml 0,005 M KPO_4 - Puffer (pH 7,2; Leitfähigkeit 1,1 mmho) bei einer Flußrate von 65 ml/Std. gespült. Während sich am Austauscher eine intensiv grüne, etwa 5 cm breite Proteinbande bildete, zeigte sich durch Messung der Absorption ($A_{254\ nm}$ und $A_{280\ nm}$) bereits ein Elutionspeak eines nicht gebundenen Proteins, der in 55 Einzelfraktionen (8,8 ml) aufgefangen wurde.

Im Anschluß daran wurde ein kontinuierlicher KPO_4-Puffergradient von 0,005 M - 0,2 M (pH 7,2; Leitfähigkeit 1,1-31,5 mmho) angelegt. Die Elution erfolgte mittels peristaltischer Pumpe bei konstant gehaltener Flußrate von 65 ml/Std. Das Eluat wurde nach Anlegen des Gradienten in 165 Einzelfraktionen zu je 8,8 ml aufgefangen.

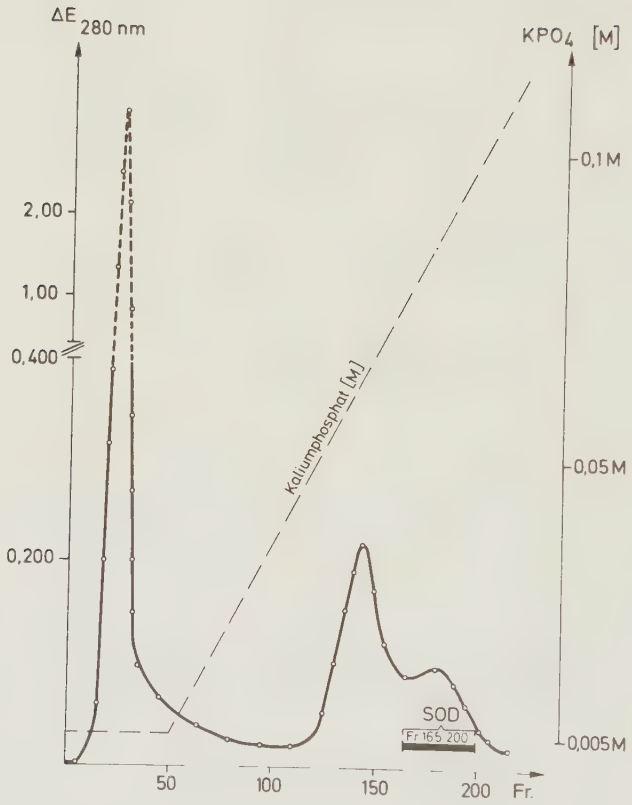


Abb. 24: Elutionsdiagramm der mit 0,005 M KPO_4 - Puffer (pH 7,2; Leitfähigkeit 1,1 mmho) äquilibrierten DEAE A 50 Säule von normalen Human-Erythrocyten.
Elution durch linearen KPO_4 - Puffergradienten (0,005 - 0,2 M). Die Einzelfraktionen (8,8 ml) wurden auf ihren Proteingehalt ($A_{280\ nm}$) und ihre Superoxiddismutase-Aktivität (SOD) untersucht (siehe Mat. und Methoden 2.3.4.2.1.).

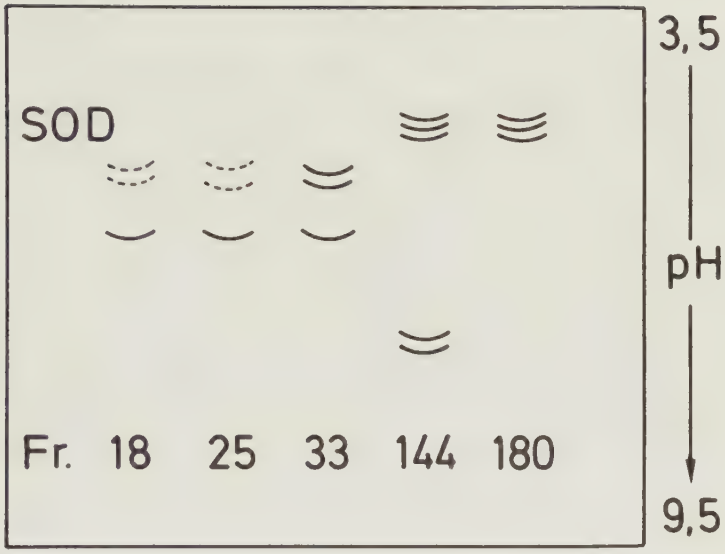


Abb. 25: Isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamidgel (PAG-plate, pH 3,5 - 9,5) der angegebenen Eluatfraktionen von normalen Human-Erythrocyten nach Sephadex G 75 Säulenchromatographie (Methode siehe Legende zu Abb. 16).

Im ersten, sehr steilen Gipfel (Fr. 18-33) ließ sich ein Fremdprotein quantitativ abtrennen. Zwei weitere kathodische Fremdproteine bildeten den zweiten Gipfel (Fr. 144), der auch schon drei schwache Banden mit Superoxiddismutase-Aktivität erkennen ließ. Der Hauptanteil der Superoxiddismutase-Aktivität wurde mit dem dritten, flachen Gipfel (Fr. 165-200) eluiert. Hier ließen sich keine Verunreinigungen durch Fremdproteine mehr auf dem Gel erkennen. Dementsprechend wurden die Fraktionen 166 - 220 (gesamt 480 ml) gepoolt und mit einer Amicon YM 10 Ultrafiltrationsmembran auf ein Volumen von 4,2 ml eingeengt. Das Ultrafiltrat war hellgrün und klar.

3.2.9. Entsalzung über Sephadex G 25

12,5 g Sephadex G 25 Coarse wurden in 80 ml 0,005 M KPO_4 - Puffer (pH 7,5; Leitfähigkeit 0,7 mmho) drei Stunden gequollen und anschließend unter mehrfachem Pufferwechsel über vier Stunden äquilibriert. Das Gel wurde im Kühlraum (4 °C) in eine geeignete Säule (Länge 40 cm, Ø 16 mm) gefüllt und mit ca. 500 ml 0,005 M KPO_4 - Puffer (pH 7,5; Leitfähigkeit 0,7 mmho) weiter äquilibriert. Nach Auftragen der Probe (4,2 ml) auf die glatte Geloberfläche wurde bei konstanter Flußrate von 45 ml/Std. unter gleichzeitiger Absorptionsmessung bei $A_{254\ nm}$ und $A_{280\ nm}$ eluiert. Als Elutionspuffer diente 0,005 M KPO_4 - Puffer (pH 7,5; Leitfähigkeit 0,7 mmho). Das Eluat wurde in 14 Einzelfraktionen (2,8 ml) aufgefangen.

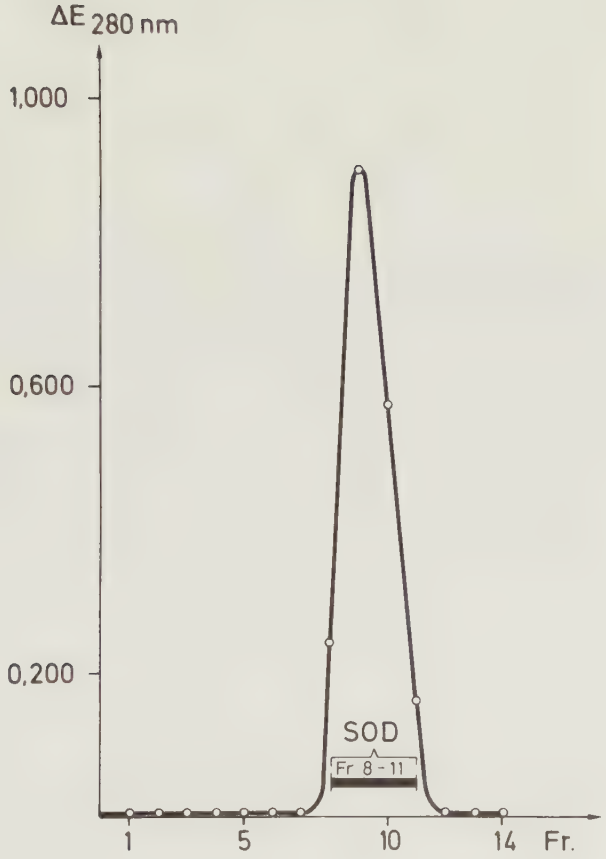


Abb. 26: Elutionsdiagramm nach Sephadex G 25 Chromatographie der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutase aus normalen Human-Erythrocyten. Elution mit 0,005 M KPO_4 - Puffer (pH 7,5; Leitfähigkeit 0,7 mmho).
Der scharfe Salzpeak (Fr. 20-24) ist auf der Abbildung nicht dargestellt.

Die proteinhaltigen Fraktionen 8 - 11 wurden gepoolt (gesamt 11,2 ml), durch ein steriles Filter gepreßt (Porengrösse < 0,2 µm) und bis zur weiteren Enzymanalyse bei 4 °C in einem sterilen Gefäß aufbewahrt.

3.2.10. Reinigungstabelle

Die einzelnen Stufen der Präparation von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Bei der dargestellten Präparation wurden 48 mg der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutase mit einer spezifischen Aktivität von 3580 U/mg Protein bei 7,5 % Ausbeute erhalten. Bei einem Gesamtreinigungsfaktor von 953 gegenüber dem Ausgangsmaterial wurde das Endprodukt nach der DEAE-Chromatographie gegenüber der erhaltenen Proteinfraktion nach G-75-Chromatographie um den Faktor 3,6 bei relativ geringem Ausbeute-Verlust weiter gereinigt.

Reinigungstabelle für die Präparation von Cu/Zn Superoxiddismutase aus normalen menschlichen Erythrocyten:

Reinigungsschritt	Vol. (ml)	Proteinkonz. (mg/ml)	Gesamt Protein (g)	Aktivität (U/ml)	Gesamt Aktiv. (U)	Spezif.Aktiv. (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor
Hämoglobinfällung	3500	1,75	6,125	656	2296000	3,75	100	1
Äthanolphase	1500	0,81	1,215	802	1203000	990	52	264
Dialysat	180	2,56	0,461	2470	444600	965	19	257
nach G75-Chromatographie	50	6,09	0,305	6100	305000	1005	13	267
nach DEAE A50-Chromatographie	13	3,7	0,048	13250	172250	3580	7,5	953

3.2.11. **Reinigungsgel**

Zur Übersicht der schrittweisen Anreicherung der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten während des Trennungsganges dient Abb. 27.

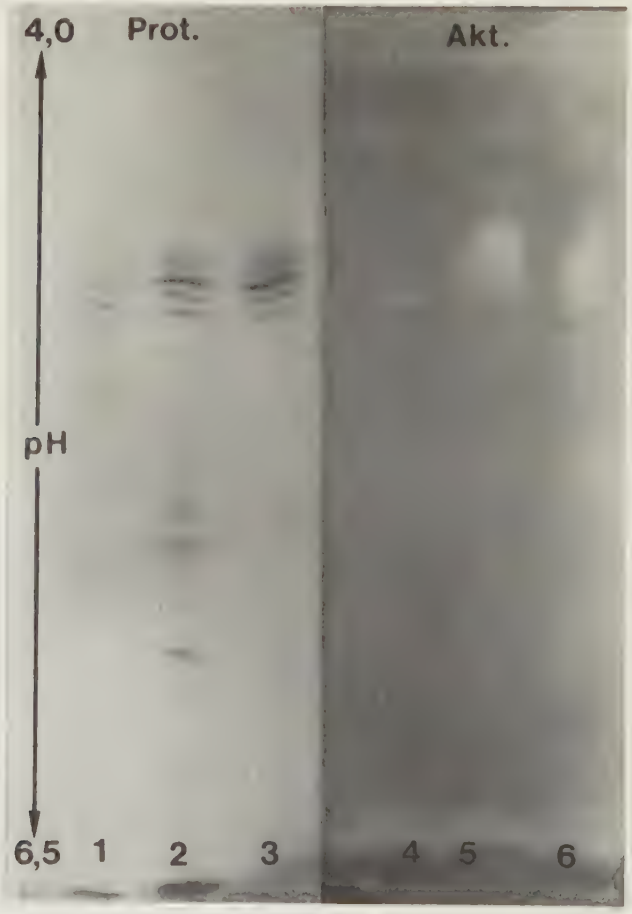


Abb. 27: Proteinauftrennung (Banden 1 - 3) und Aktivitätsnachweis mittels Hemmung der Photoreduktion von Nitrotetrazoliumblau (Banden 4 - 6) von Proben der einzelnen Reinigungsschritte

von Cu/Zn Superoxiddismutase aus normalen menschlichen Erythrocyten durch isoelektrische Fokussierung (PAG-plate, pH 4,0 - 6,5; siehe Mat. und Methoden 2.3.3.3. und 2.3.5.1.). Die bei jedem Reinigungsschritt jeweils eingesetzte Proteinmenge betrug 10 µg.

1. Nach Hämoglobinfällung	
2. Nach G-75 und Ultrafiltration, Fr. 45 - 105	Proteinauftrennung
3. Nach DEAE A-50 und Ultrafiltration, Fr. 165 - 200	
4. Nach Hämoglobinfällung	
5. Nach G-75 und Ultrafiltration, Fr. 45 - 105	Aktivitätsnachweis
6. Nach DEAE A-50 und Ultrafiltration, Fr. 165 - 200	

3.3. Analytische Untersuchungen mit den gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Rinder-Milzgewebe und Human-Erythrocyten

3.3.1. Auftrennung der Proteine durch Polyacrylamid Diskgelelektrophorese

Die gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen aus normaler Rindermilz und BLV-positiver Rindermilz sowie aus normalen menschlichen Erythrocyten wurden nach Polyacrylamid Diskgelelektrophorese auf Superoxiddismutase-Aktivität und Proteinverteilung untersucht (siehe Mat. und Methoden 2.3.3.3.2. und 2.3.5.2.) und mit dem Proteinmuster von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindererythrocyten (Diagn. Data, Mountain View, California, USA) verglichen (Abb. 28).

Gelpaar 1 Präparation von Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz.

Gelpaar 2 Präparation von Cu/Zn Superoxiddismutase aus BLV-positiver Rindermilz.

Gelpaar 3 Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindererythrocyten (Diagn. Data, Mountain View, California, USA).

Gelpaar 4 Präparation von Cu/Zn Superoxiddismutase aus normalen menschlichen Erythrocyten.

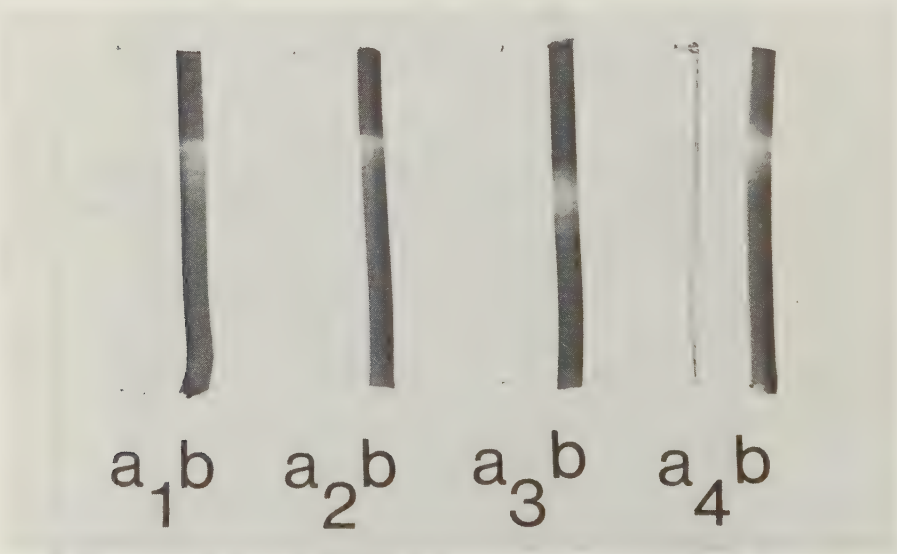


Abb. 28: Polyacrylamid Diskgelelektrophorese der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen von normaler Rindermilz (1), BLV-positiver Rindermilz (2), einer Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rin-

dererythrocyten (3) und von normalen Human-Erythrocyten (4). Die Gelherstellung und Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach der Methode von Davis (18). Dabei wurde ein Gel mit 7,5 % Acrylamid, pH 8,9 verwendet. Elektrophoresebedingungen: nach einer Präelektrophorese mit 1,5 mA pro Gel bei 120 - 180 V für 1 Std. ohne Probenauftragung erfolgte die Elektrophorese der Proben mit 2 mA pro Gel bei 220 - 250 V und 12 °C über 2 Stunden. Auf jedes Proteingel wurden 5 µg Protein, auf jedes Aktivitätsgel 1 µg Protein aufgetragen.
Die Proteingele (jeweils Gel a der 4 Gelpaare) wurden anschließend mit 0,5 % Amidoschwarz (w/v) in 7 % Essigsäure (v/v) gefärbt. Die Entfärbung wurde mit 7 % Essigsäure durchgeführt.

Superoxiddismutase-Aktivität wurde durch Hemmung der photochemischen Reduktion von Nitrotetrazoliumblau (NBT) im gleichen Ansatz (jeweils Gel b der 4 Gelpaare) dargestellt. Dazu wurden die Gele zunächst für 20 min in NBT ($2{,}45 \times 10^{-3}$ M NBT (w/v) in 0,036 M KPO_4-Puffer, pH 7,8) und anschließend in einer Lösung (0,028 M Tetramethyläthylendiamin, $2{,}8 \times 10^{-3}$ M Riboflavin, 0,036 M KPO_4-Puffer, pH 7,8) inkubiert. Nach 15 minütiger UV-Bestrahlung war die Superoxiddismutase-Aktivität auf dem Gel in Form achromatischer Banden zu erkennen.

Die Präparation aus normaler Rindermilz (Gel 1a,b) weist drei Superoxiddismutase-aktive Banden (Gel 1b) auf, wobei sich die Banden mit zunehmender Mobilität schwächer darstellen. Entsprechend lassen sich auf dem Proteingel (1a) zwei Banden erkennen, die den beiden oberen Aktivitätsbanden zuzuordnen sind. Die Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz ist damit in ihrem Aktivitäts- und Proteinmuster dem gereinigten Enzym aus Rindererythrocyten weitgehend vergleichbar (Gel 3 a,b). Die aus BLV-positiver Rindermilz isolierte Cu/Zn Superoxiddismutase zeigt zwei Aktivitätsbanden (Gel 2b), denen zwei Proteinbanden auf dem Proteingel (Gel 2a) entsprechen.
Bei der Enzympräparation aus normalen menschlichen Erythrocyten (Gel 4b) kommen eine starke Aktivitätsbande und darunter eine elektrophoretisch schneller wandernde schwächere Aktivitätsbande zur Darstellung. Auf dem Proteingel (Gel 4a) lassen sich zwei zuordbare Proteinbanden erkennen.
Somit lassen sich bei den aufgetragenen Proben der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Rinder-Milzgewebe und Human-Erythrocyten der jeweiligen Proteinbande die Aktivitätsbanden ein-

deutig zuordnen. Unter den angegebenen Bedingungen war auf keinem Proteingel ein Hinweis auf ein Fremdprotein oder denaturiertes Protein erkennbar. Die differente Mobilität der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rinder- und Human-Erythrocyten (Abb.28,3 und 4) gegenüber den beiden Enzymen aus Rindermilz (Abb. 28,1 und 2) gibt einen Hinweis auf verschiedene Ladungs- oder Molekülgröße-Eigenschaften, nach denen in diesem analytischen Verfahren getrennt wird.

3.3.2. Auftrennung der Proteine durch zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese

Mit der zweidimensionalen Polyacrylamid Gelelektrophorese (Methode siehe Mat. und Methoden 2.3.5.3.) wurden die Proteinmuster der Enzympräparationen aus normaler Rindermilz, aus BLV-positiver Rindermilz und aus normalen menschlichen Erythrocyten untersucht. Ferner konnte das Molekulargewicht der Enzyme näherungsweise bestimmt werden.

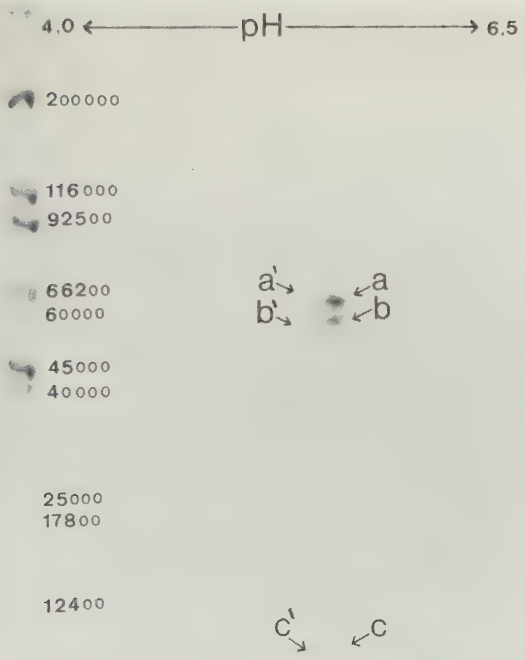


Abb. 29: Zweidimensionale Gelelektrophorese der Enzympräparation aus lymphatischem Milzgewebe vom gesunden Rind.

In der ersten Dimension (Isoelektrische Fokussierung, Methode siehe Mat. und Methoden 2.3.5.3.1. ff.) wurden je Rundgel insgesamt 10 µg Protein aufgetragen (0,005 M KPO_4-Puffer, pH 7,2, Probevolumen: 7 - 37 µl). Die Fokussierung erfolgte über einen pH-Gradienten in einem Bereich von pH 4,0 - 6,5. Elektrophoresebedingungen: 5 mA bei 200 V über 15 1/2 Stunden.

In der zweiten Dimension (Polyacrylamid Gradientengel, siehe Mat. und Methoden 2.3.5.3.2. ff.) wurden das Rundgel nach der 1. Dimension und eine Eichprotein-Lösung (5 µl) mit folgenden 10 Eichproteinen (Molekulargewicht in Dalton) aufgetragen:

1) Myosin (200000), 2) beta-Galactosidase (116000), 3) Phosphorylase B (92500), 4) Rinder-Serumalbumin (66200), 5) Katalase (60000), 6) Ovalbumin (45000), 7) Aldolase (40000), 8) Chymotrypsinogen (25000), 9) Myoglobin (17800), 10) Cytochrom c (12400).

Elektrophoresebedingungen: 30 - 40 mA bei 250 V über 4 3/4 Stunden. Färbung mit 0,25 % Coomassie Brilliant Blue.

spot "a" : 66000 Dalton bei pH 5,5
spot "b" : 58000 Dalton bei pH 5,5
spot "c" : <10000 Dalton bei pH 5,5

spot a' : 66000 Dalton bei pH 4,9
spot b' : 58000 Dalton bei pH 4,9
spot c' : <10000 Dalton bei pH 4,9

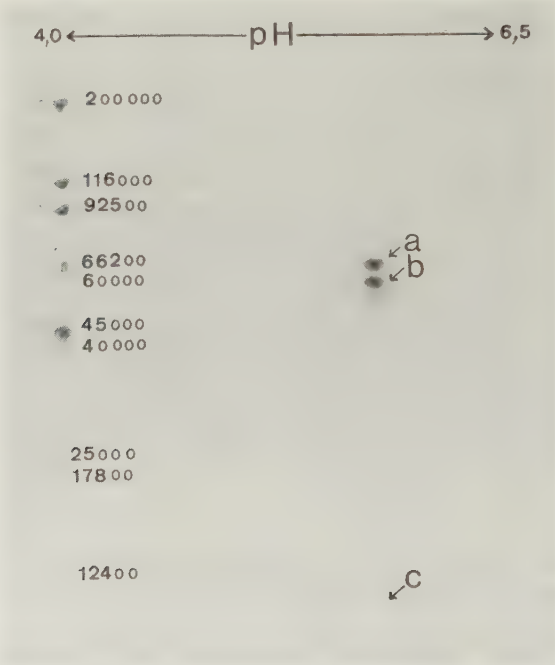


Abb. 30: Zweidimensionale Gelelektrophorese der Enzympräparation aus lymphatischem Gewebe vom BLV-positiven Rind. Angaben zur Methodik s. Abb. 29.

spot "a" : 66000 Dalton bei pH 5,5
spot "b" : 58000 Dalton bei pH 5,5
spot "c" : <10000 Dalton bei pH 5,5

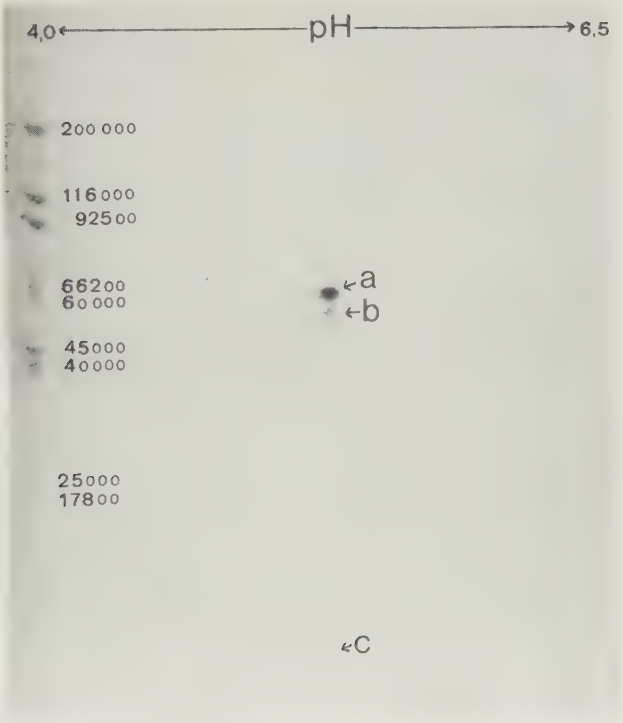


Abb. 31: Zweidimensionale Gelelektrophorese der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindererythrocyten (Diagn. Data, Mountain View, California, USA).
Angaben zur Methodik s. Abb. 29.

spot "a" : 66000 Dalton bei pH 4,9
spot "b" : 58000 Dalton bei pH 4,9
spot "c" : <10000 Dalton bei pH 4,9

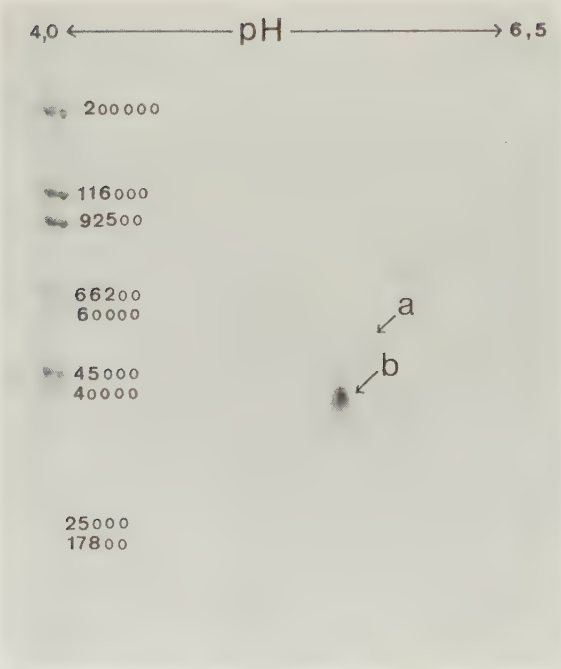


Abb. 32: Zweidimensionale Gelelektrophorese der Enzympräparation aus normalen menschlichen Erythrocyten.
Angaben zur Methodik s. Abb. 29.

spot "a" : 51000 Dalton bei pH 5,1
spot "b" : 36000 Dalton bei pH 4,6

Die Präparationen aus normaler und BLV-positiver Rindermilz lassen beide einen stark anfärbbaren Protein-spot bei einem Molekulargewicht von 66000 Dalton und einem isoelektrischen Punkt von näherungsweise pH 5,5 sowie darunter ein schwächeres Protein bei einem Molekulargewicht von 58000 Dalton erkennen. Die in Abb. 29 zusätzlich sehr schwach nachweisbaren spots a'-c' liegen bei pH 4,9. Dieses "Mapping" entspricht dem Proteinmuster der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindererythrocyten (Diagn. Data, Mountain View, California, USA). Die bei allen drei Gelelektrophoresen des Rindersystems beobachteten und als "spot c" bezeichneten Proteinflecke am unteren Gelrand in einem Molekulargewichtsbereich von <10000 Dalton sind Peptide, die unter den angegebenen Elektrophoresebedingungen mit SDS vom Nativprotein abgespalten wurden.

Die Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten liefert gegenüber den Rindererythrocyten ein anderes Proteinmuster. Neben einem sehr kräftigen Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 36000 Dalton und einem isoelektrischen Punkt von näherungsweise pH 4,6 wird ein schwächerer spot bei etwa 51000 Dalton und einem isoelektrischen Punkt von pH 5,1 darstellbar.

3.3.3. Molekulargewicht

Die Bestimmung der Molekulargewichte für die Untereinheiten der isolierten Cu/Zn Superoxiddismutasen aus normaler Rindermilz, BLV-positiver Rindermilz und normalen menschlichen Erythrocyten sowie zum Vergleich von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindererythrocyten (Diagn. Data, Mountain View, California, USA) erfolgte durch Polyacrylamid-Diskgelelektrophorese in Anwesenheit von 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS). Für die Auswertung über Eichgeraden (Auftragung des Molekulargewichtes gegen die Mobilität der Proteine im semilogarithmischen Maßstab) wurde die Mobili-

tät von 5 Eichproteinen mit bekanntem Molekulargewicht berechnet und für jeden Elektrophoreselauf neu ermittelt (nähere Angaben zur Technik siehe Mat. und Methoden 2.3.5.5.).

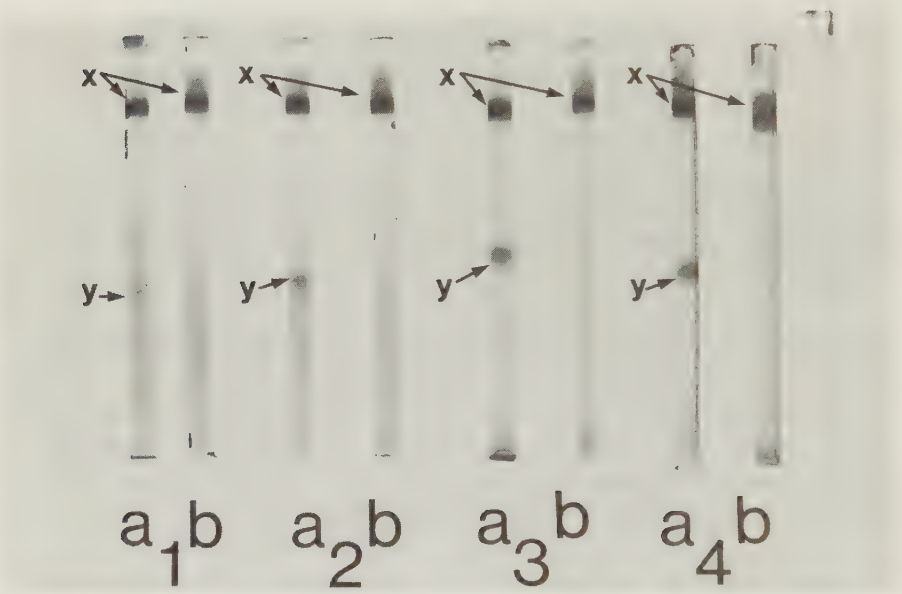


Abb. 33: 1% SDS Polyacrylamid Diskgelelektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung der Cu/Zn Superoxiddismutasen:

normale Rindermilz (1), BLV-positive Rindermilz (2), Rindererythrocyten (3) und Human-Erythrocyten (4).
Die Herstellung der Gele, die Durchführung der Elektrophorese und die Auswertung erfolgten nach der Methode von Weber und Osborn (94). Die Färbung der Gele wurde mit 0,25 % Coomassie Brilliant Blue (w/v) in 20 % Trichloressigsäure (w/v) in wässriger Lösung durchgeführt. Die Entfärbung erfolgte durch 7 % Essigsäure.

Bei den Gelen a der 4 Gelpaare erfolgte die Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen (2-stündige Vor-Inkubation der Probe

in 0,1 % beta-Mercaptoäthanol bei 56 °C).
Bei den Gelen b wurde sie unter nicht reduzierenden Bedingungen (2-stündige Inkubation der Probe ohne beta-Mercaptoäthanol bei 20 °C) durchgeführt.
Weitere Angaben zur Methode und Auswertung der Elektrophorese siehe Mat. und Methoden 2.3.5.5. ff.). Die Probenläufe mit Proteinmarkern sind in der Abbildung nicht dargestellt.

Gelpaar 1 : Präparation von Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz.

Gelpaar 2 : Präparation von Cu/Zn Superoxiddismutase aus BLV-positiver Rindermilz.

Gelpaar 3 : Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindererythrocyten. (Diagn. Data, Mountain View, California, USA).

Gelpaar 4 : Präparation von Cu/Zn Superoxiddismutase aus normalen menschlichen Erythrocyten.

Auf jedes 1 % - SDS Polyacrylamid Diskgel wurden 15 µg Protein aufgetragen.

Alle acht Gele weisen eine starke Bande (x) mit relativ geringer elektrophoretischer Beweglichkeit auf. Diese entsprechen den oberen Banden der Gele 1b-4b der 4 Gelpaare in Abb. 33, bei denen die Elektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen erfolgt war.
Bei den Gelen 1a - 4a in Abb. 33 unter reduzierenden Bedingungen, bei denen diese beschriebene Bande vergleichsweise schwächer zur Darstellung kommt, ist zusätzlich noch eine zweite Bande höherer Mobilität (y) und somit geringeren Molekulargewichts erkennbar.

Durch Auswertung über Eichgeraden (siehe Mat. und Methoden 2.3.5.5.8.) ließen sich im einzelnen folgende Molekulargewichte für die Banden ermitteln:

	Molekulargewicht (Dalton)	
	reduz. Bedingungen	nicht reduz. Bedingungen
Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz	x = 72 600 y = 14 700	74 800
Cu/Zn Superoxiddismutase aus BLV-positiver Rindermilz	x = 72 600 y = 15 200	74 800
Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rinder-Erythrocyten	x = 66 800 y = 18 300	72 500
Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlichen Erythrocyten	x = 74 300 y = 16 600	75 800

Insgesamt ergibt sich aus dieser Molekulargewichtsbestimmung (1 % SDS Diskgelelektrophorese) für die angegebenen Cu/Zn Superoxiddismutasen folgendes Verhalten:

Unter den reduzierenden Bedingungen (0,1 % beta-Mercaptoäthanol) erhält man für die Untereinheit des Rinderenzyms aus Normalmilz und BLV-positiver Milz ein mittleres Molekulargewicht von 15000 Dalton, während das Referenzenzym aus Rindererythrocyten (Diagn. Data, Mountain View, California, USA) für die Untereinheit ein Molekulargewicht von 18000 Dalton zeigt. Für die Untereinheit der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten wurde unter diesen Bedingungen ein Molekulargewicht von 16000 Dalton bestimmt.

Das Molekulargewicht der hochmolekularen Aggregate, das sich nach Diskgelelektrophorese (1 % SDS) mit bzw. ohne beta-Mercaptoäthanol (0,1 %) ergibt, ist bei den beiden untersuchten Superoxiddismutasen aus Rindermilz jeweils identisch (72600 bzw. 74800 Dalton), während das Molekulargewicht dieses Aggregats des Enzyms aus Rindererythrocyten unter beiden Bedingungen niedriger liegt (66800 bzw. 72500 Dalton).

3.3.4. Metallgehaltsanalyse

Der Kupfer- und Zinkgehalt der Enzympräparationen aus normler Rindermilz, BLV-positiver Rindermilz und normalen menschlichen Erythrocyten wurde atomabsorptionsspektrophotometrisch bestimmt (siehe Mat. und Methoden 2.3.5.4.). Die Proteinbestimmung in den Enzymlösungen erfolgte dabei über Absorptionsmessung bei 259 nm und 266 nm.
Die bei der Wellenlänge 259 nm (Rinderenzyme) bzw. 266 nm (menschliches Erythrocytenenzym) gegen den Lösungspuffer gemessenen Extinktionsmaxima dienten zusammen mit den von Weser (97)

für Rinder-Superoxiddismutasen ($\varepsilon_{259\ nm}$ = 9840 $M^{-1}cm^{-1}$) bzw. von Stansell und Deutsch (89) für Superoxiddismutasen aus menschlichem Gewebe ($\varepsilon_{266\ nm}$ = 18700 $M^{-1}cm^{-1}$) angegebenen molaren Absorptionskoeffizienten zur Berechnung der Proteinkonzentration (siehe Mat. und Methoden 2.3.1.3.).

Cu/Zn Superoxiddismutase-Enzymlösungen

	normale menschl. Erythrocyten n. G-25 (Entsalzung)	normale Rindermilz nach DEAE A-50	BLV-positive Rindermilz n. DEAE A-50
gemessene Extinktion ($E_{259/265nm}$)	0,530	0,410	0,238
$\varepsilon_{259/265nm}$ ($M^{-1}cm^{-1}$)	18700	9840	9840
Molekulargewicht (Dalton)	33000	32600	32600
Molarität (mol/l)	$2,83 \times 10^{-5}$	$4,16 \times 10^{-5}$	$2,41 \times 10^{-5}$
gemessene Werte (Mittelwert aus 5 Messungen			
Cu (µg/ml)	4,22	4,19	2,63
Zn (µg/ml)	4,05	4,85	2,0
Daraus errechnete Molarität			
Cu (mol/l)	$6,65 \times 10^{-5}$	$6,60 \times 10^{-5}$	$4,02 \times 10^{-5}$
Zn (mol/l)	$6,19 \times 10^{-5}$	$7,42 \times 10^{-5}$	$3,06 \times 10^{-5}$

Den Berechnungen wurde für Kupfer ein Molekulargewicht von 63,5 Dalton und für Zink ein Molekulargewicht von 65,4 Dalton zugrundegelegt.

Aus den gemessenen Kupfer- und Zinkwerten errechnet sich für die

normale Rindermilz	1,6 (± 0,2) g Atom Kupfer und 1,8 (± 0,2) g Atom Zink pro Mol Superoxiddismutase
BLV-positive Rindermilz	1,7 (± 0,2) g Atom Kupfer und 1,4 (± 0,2) g Atom Zink pro Mol Superoxiddismutase
Human-Erythrocyten	2,3 (± 0,2) g Atom Kupfer und 2,2 (± 0,2) g Atom Zink pro Mol Superoxiddismutase

Im Vergleich zu den Kupfer- und Zinkwerten der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Human-Erythrocyten (Trennungsgang siehe 3.2.) ist der g-Atom Kupfer- bzw. g-Atom Zink-Wert pro Mol des gereinigten Enzyms aus Rindermilz (Trennungsgang siehe 3.1.) deutlich niedriger, wobei der relative Verlust an Kupfer höher liegt.

3.3.5. Pulsradiolyse

Zur Untersuchung der katalytischen Aktivität der gereinigten Superoxiddismutasen aus normalen Erythrocyten, normaler Rindermilz und BLV-positiver Rindermilz diente die Pulsradiolyse als direktes Nachweisverfahren (siehe Mat. und Methoden 2.3.4.1.).

Es wurden jeweils zwei unterschiedliche Konzentrationen eines Superoxiddismutase- Enzyms eingesetzt; bei beiden Konzentrationen wurden je vier Einzelmessungen durchgeführt, aus denen die Mittelwerte der Geschwindigkeitskonstanten und deren Standardabweichungen bestimmt wurden.

Die Messung der Reaktionsgeschwindigkeiten erfolgte in sauerstoffgesättigten und formiathaltigen Lösungen (0,1 M Formiat).

Die Ergebnisse mit den dazugehörigen Versuchsbedingungen werden tabellarisch wiedergegeben:

		menschl. Erythrocyten nach DEAE	normale Rindermilz nach DEAE	BLV-pos. Rindermilz nach DEAE
pH der Meßlösung		7,2	7,6	7,6
Dosis pro Bestrahlungspuls (krad)		3,30	2,93	2,93
gebildete Menge an Superoxidradikalen (M/Puls)		$2,1 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$
Probenkonzentration in der Küvette (M)	(1)	$3,1 \times 10^{-6}$	$4,0 \times 10^{-6}$	$2,2 \times 10^{-6}$
	(2)	$6,6 \times 10^{-7}$	$8,6 \times 10^{-7}$	$4,7 \times 10^{-7}$
Reaktionsgeschwindigkeit K_2 ($M^{-1}sec^{-1}$)	(1)	$1,16 \pm 0,10 \times 10^{9}$	$1,34 \pm 0,06 \times 10^{9}$	$1,39 \pm 0,05 \times 10^{9}$
	(2)	$1,18 \pm 0,13 \times 10^{9}$	$1,37 \pm 0,11 \times 10^{9}$	$1,07 \pm 0,05 \times 10^{9}$

Die Reaktionskonstante der Spontandismutation von Superoxidradikalen beträgt unter den hier vorliegenden Versuchsbedingungen $2,95 \pm 1,1, \times 10^{5}\ M^{-1}sec^{-1}$.
Bei einem weiteren Versuch, in dem Cu/Zn Superoxiddismutase aus

menschlichen Erythrocyten in einer Konzentration von $1,6 \times 10^{-6}$M eingesetzt wurde, wurden durch 20 aufeinander folgende Einzelpulse mit einer Einzeldosis von jeweils 3,30 krad Superoxidradikale in einer Gesamtkonzentration von $4,2 \times 10^{-4}$M gebildet. Nach Umsetzen dieser gegenüber der Enzymkonzentration 260-fach höheren Superoxidradikalkonzentration zeigte die Superoxiddismutase keinerlei Aktivitätseinbuße.
Die Analyse der Reaktionsordnungen ergab für alle drei untersuchten Enzyme des humanen und des bovinen Systems eindeutig eine erste Ordnung.

Im Vergleich zur Literatur (51, 81) liegen alle ermittelten Werte für die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen im Normbereich.

3.3.6. Immunologische Untersuchungen mit gereinigter Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten

Als zusätzliches Reinheitskriterium der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten wurden immunologische Verfahren angewandt, die als äußerst sensible Methoden zur Analyse von Fremdproteinverunreinigungen gelten.
Die Untersuchungen wurden im Labor von Herrn Professor Dr. Lamerz, Med. Klinik II im Klinikum Großhadern der Universität München, durchgeführt.
Zur Gewinnung von polyklonalen monospezifischen Antikörpern gegen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten wurden einem weiblichen New Zealand-Kaninchen nach einer modifizierten Methode von Hijmans et al. (38) 2 x 0,5 mg Antigen (Human-Erythrocyten-Superoxiddismutase n. G-25 Chromatographie) in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung mit komplettem (1) bzw. inkomplettem (2) Freund'schem Adjuvans subcutan und nach drei Wochen weitere 0,5 mg Antigen als Aluminiumpräzipitat in sechs Einzel-

dosen über drei Wochen intravenös appliziert. Die Untersuchung des Antiserums erfolgte mittels Ouchterlony-Immundiffusionstest auf Objektträgern (Difco-Agar 2 %). Dazu wurde im zentralen Reservoir einer Sechsfach-Rosette das Kaninchen-Antiserum eingefüllt und im Ansatz gegen Cu/Zn SOD aus Human-Erythrocyten, Normalserum, Antiserum gegen alpha-1-Antitrypsin, Antiserum gegen alpha-1-Glykoproteid, Antiserum gegen alpha-2-Chymotrypsin (nicht in Abb. 34 gezeigt) und Perchlorsäuregefälltes Normalserum eingesetzt. Wie aus Abb. 34 hervorgeht, entwickelte sich eine starke Präzipitatlinie zwischen dem Antiserum und SOD; daneben ist eine sehr schwache Präzipitatlinie gegen Normalserum zu erkennen. Der Versuch einer Identifizierung der Präzipitatlinie gegen Normalserum verlief negativ für den Vergleich mit Antisera gegen alpha-2-Chymotrypsin und alpha-1-Glykoproteid und war wegen der sehr schwachen Linie nicht eindeutig positiv für Antiserum gegen alpha-1-Antitrypsin. Bei Auftragung von 100 µg SOD n. G-25 Chromatographie auf eine Säule TSK GW 4000 (Fa. LKB, Bromma, Schweden) erhielt man eine Hauptfraktion (96 %) mit einem Molekulargewicht von näherungsweise 32000 und eine minimale Nebenfraktion (4 %) mit niedrigerem Molekulargewicht. Die nur geringe Verunreinigung des Anti-SOD-Antiserums war in einem weiteren Versuch durch einmalige Absorption mit Normalserum (5 mg Lyophilisat/ml) zu eliminieren.

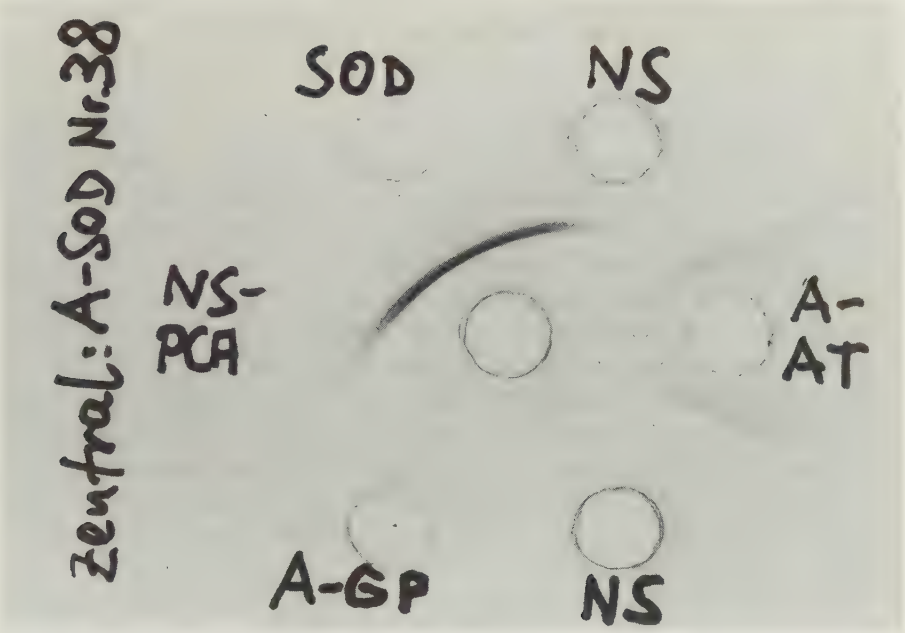


Abb.34: Ouchterlony-Immundiffusionstest zum Nachweis der Antikörperbildung gegen Cu/Zn.Superoxiddismutase aus Humanerythrocyten.
Von einem gegen Cu/Zn SOD aus Human-Erythrocyten n. G-25-Chromatographie immunisierten Kaninchen wurden 15 µl Serum in das zentrale Stanzloch einer Objektträger-Agarplatte gefüllt. In die konzentrisch um das zentrale Reservoir angeordneten Reservoire wurden je 15 µl Normalserum (NS), Anti-alpha-1-Antitrypsin Antiserum (A-AT), Perchlorsäuregefälltes Normalserum (NS-PCA), Anti-alpha-1-Glykoproteid Antiserum (A-GP) und Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten nach G-25 Chromatographie (SOD) pipettiert. Nach 36-stündiger Beobachtungsdauer und 24-stündigem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung wurden die Präzipitate mit Azocarmin-Lösung (in Eisessig und Methanol im Verhältnis 10:90 v/v) gefärbt.

3.3.7. Immunologische Untersuchungen mit gereinigter Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindergewebe

Um einen der Species-Verschiedenheit entsprechenden strukturellen Unterschied zwischen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindergewebe und Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten nachzuweisen, wurde ein weiterer Ouchterlony-Immundiffusionstest auf einem Objektträger (Difco-Agar 2%) durchgeführt.
Hierbei wurde wieder im zentralen Stanzloch einer Sechsfach-Rosette der aus Kaninchen gewonnene polyklonale monospezifische Antikörper gegen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (siehe 3.3.6.) eingefüllt und gegen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten, Cu/Zn Superoxiddismutase aus BLV-positiver Rindermilz, Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz und Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindererythrocyten (Fa. Diagn. Data, USA), sowie gegen Kochsalz und Normalserum eingesetzt.
Wie Abbildung 35 zeigt, entwickelte sich eine starke Präzipitatlinie zwischen dem Antiserum und Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten, während keinerlei Reaktion zwischen dem Antiserum und den drei Präparationen von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindergewebe (BLV-positive Rindermilz, normale Rindermilz und Rindererythrocyten) erfolgte.

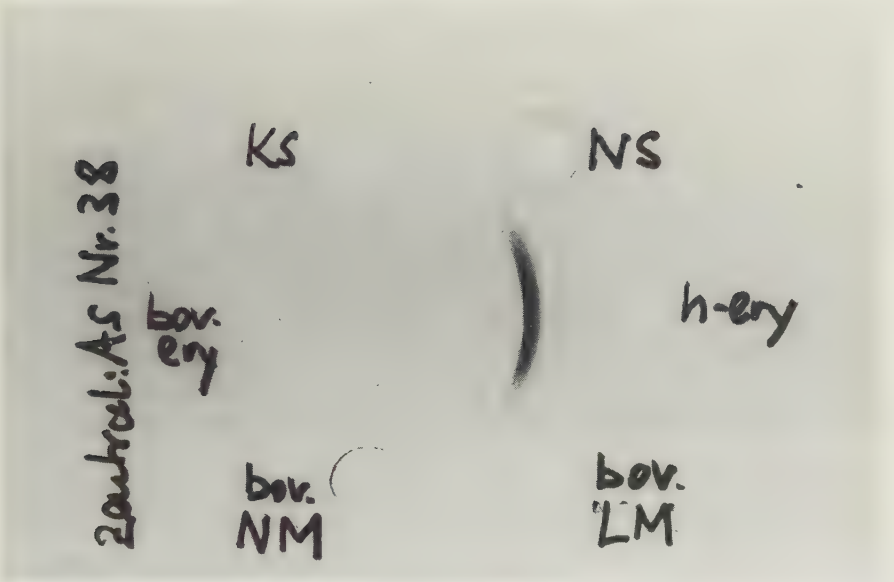


Abb. 35: Ouchterlony-Immundiffusionstest zum Nachweis eines strukturellen Unterschieds zwischen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten und Rindergewebe.
Das in das zentrale Stanzloch eingefüllte Serum (ca. 15 µl) eines gegen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten immunisierten Kaninchens diffundierte gegen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (h-ery), Cu/Zn Superoxiddismutase aus BLV-positiver Rindermilz (bov. LM), Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz (bov. NM), Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindererythrocyten (Fa. Diagn. Data, USA) (bov. ery), sowie gegen Kochsalz (KS) und Normalserum (NS). Näheres zur Technik siehe Abb. 34, Seite 125.

4. DISKUSSION

Bei der erstmals erfolgten Reinigung der Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz (39) wurde im Endprodukt eine spezifische Aktivität von 1666 U/mg bei 241-facher Anreicherung gemessen. Diese Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindergewebe wurde mit der isolierten Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlicher Lymphom-Milz (39) verglichen, deren spezifische Aktivität im Endprodukt 1000 U/mg aufwies. Im Vergleich der pulsradiolytisch ermittelten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten zeigte sich, daß das Enzym aus Lymphom-Milz einen um den Faktor 5 niedrigeren Wert als das Enzym aus normaler Rindermilz , welches mit der Literatur übereinstimmende Normwerte aufwies (51, 81), erbrachte.

Auf die Bildung von toxischen Sauerstoffradikalen als Folgeprodukte der Superoxidradikalgenerierung (29, 33, 61) in der Zelle und die Schutzfunktion der Superoxiddismutasen (59, 76, 84) wurde in der Einleitung bereits hingewiesen.
Im Falle einer tumorspezifischen strukturellen oder funktionellen Minderausstattung dieser Superoxiddismutasen wäre die maligne Zelle durch eine Erhöhung der intrazellulären $\cdot O_2^-$- Konzentration selektiv angreifbar.

Auf eine Verminderung der Superoxiddismutase-Aktivität in Tumorzellen ist von verschiedenen Arbeitsgruppen hingewiesen worden (56, 68, 98). Ebenso wurde ein Fehlen der mitochondrialen Mn Superoxiddismutase in Leukämiezellen (41, 99) und Lymphomzellen (39, 40) berichtet. In einer neueren Arbeit (56) wurde die Superoxiddismutase-Aktivität in 31 normalen und neoplastischen Human-Zellinien untersucht. Dabei fand sich in den Tumorzellen eine verminderte Cu/Zn Superoxiddismutase-Aktivität, während die Mn Superoxiddismutase-Aktivität keine eindeutige Zuordnung erlaubte. Die bisher publizierten Ergebnisse über qualitative oder quantitative Unterschiede des Superoxiddismutase-Gehaltes

bzw. -Aktivität stammen aus Untersuchungen an Zellhomogenaten oder Zellfraktionen. Aus diesem Grunde erscheint die Untersuchung der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutase aus normalem und malignem Gewebe gleicher Spezies zur Klärung fraglicher struktureller Unterschiede erstrebenswert.

Im folgenden werden die Ergebnisse der Isolierung von Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz diskutiert. Dabei soll insbesondere berücksichtigt werden, inwieweit einerseits die Ergebnisse der Erstisolierung (39) reproduzierbar waren und andererseits die Reinigungstechnik verbessert werden konnte. Eine sorgfältige Analyse der Ergebnisse soll die Frage klären, ob es Hinweise auf einen strukturellen oder funktionellen Unterschied dieser Cu/Zn Superoxiddismutase gegenüber dem isolierten Enzym aus BLV-positiver Rindermilz gibt. Ebenso soll diskutiert werden, inwieweit das Stadium einer BLV-positiven Präleukose des Rinds als Tumorstadium einen Vergleich zu einem Milzlymphom des Menschen erlaubt.
Durch einen Vergleich der Ergebnisse der Isolierung von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Humanerythrocyten gegenüber denen der Rindermilzenzyme sollen bisher offene Fragen, die sich bei der Isolierung von Cu/Zn Superoxiddismutase aus humaner Lymphom-Milz mit diesem Trennverfahren ergaben (39), geklärt werden.

4.1. Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler und BLV-positiver Rindermilz

Der von Issels beschriebenen Isolierung der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindermilz (39) wurde die Präparationsmethode von Weisiger und Fridovich (95) zugrunde gelegt, die das Enzym aus Hühnerleber isolierten.

Die niedrige spezifische Aktivität (Superoxiddismutase-Aktivität auf mg Protein bezogen) im Milzrohhomogenat sowohl der normalen als auch der BLV-positiven Rindermilz (5,44 U/mg bzw. 5,8 U/mg) gegenüber dem Hühnerleber-Rohhomogenat (26,0 U/mg) stellt im Hinblick auf Ausbeute und Anreicherungsfaktor bei der hier beschriebenen Trennung besondere Anforderungen.
Ausgehend von der vergleichsweise angegebenen spezifischen Aktivität hochgereinigter Cu/Zn Superoxiddismutasen, die in verschiedenen Präparationsverfahren entweder aus Rindererythrocyten oder aus Rinderleber isoliert wurden (96), ist eine ca. 700-fache Anreicherung für das Enzym aus Milzgewebe erforderlich, die auch bei beiden Trennungsgängen erreicht wurde.
Aus der spezifischen Aktivität der hier gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindermilz und BLV-positiver Milz (4020 U/mg bzw. 3900 U/mg) läßt sich die Proteinmenge errechnen, die in den Standardverfahren der Superoxiddismutase-Aktivitätsbestimmung (23, 62) 1 Unit entspricht (249 ng Protein für Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler Rindermilz bzw. 256 ng Protein für Cu/Zn Superoxiddismutase aus BLV-positiver Rindermilz). Diese Werte entsprechen den Angaben für hochgereinigte Cu/Zn Superoxiddismutase aus tierischen Geweben (96).

Auf die besondere Bedeutung der bei der dargestellten Isolierung zusätzlich durchgeführten DEAE-Anionenaustauschchromatographie für die Reinigung des Enzyms aus Milz wurde bereits eingegangen (siehe 3.1.11.). Nach der Gelfiltrationschromatographie über Sephadex G 75 ist in der Analyse des Proteinmusters der Superoxiddismutase-aktiven Fraktionen noch ein Fremdprotein zu erkennen (siehe Abb. 18 A und B), dessen isoelektrischer Punkt höher liegt (I.P. 6,5) als der isoelektrische Punkt der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindermilzgewebe (I.P. 5,5). Aus diesem Grunde wurde eine DEAE-Chromatographie unter den angegebenen Bedingungen durchgeführt, die eine frühe Eluierung des Fremdproteins als schwächer bindendes Protein ermöglicht (siehe Abb. 19 A und B). Durch diesen zusätzlichen Reinigungsschritt konnte gegenüber dem erstmals isolierten Enzym aus Rindermilz (39) eine Verdreifachung des Anreicherungsfaktors erzielt werden.

Neben einer geringeren spezifischen Aktivität ist auch die Gesamtaktivität (Total-Units) der Superoxiddismutase im Rohhomogenat der normalen und der BLV-positiven Rindermilz deutlich niedriger (491 x 10^3 Units bzw. 579 x 10^3 Units) als im Hühnerleber-Rohhomogenat (6000 x 10^3 Units) (95). Aus dem Vergleich der Ausbeute bei beiden Enzympräparationen aus Milzgewebe nach der G 75 Chromatographie (20 %) mit der angegebenen Ausbeute (95) aus Hühnerleber (12,7 %) läßt sich im Verlauf der Trennungsgänge kein Hinweis auf eine geringere Stabilität der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Milzgewebe erkennen.

Bei der hier angegebenen Bestimmung der Superoxiddismutase-Gesamtaktivität in den Rindermilz-Rohhomogenaten wird sowohl die cytoplasmatische Cu/Zn Superoxiddismutase (95) als auch die mitochondriale Mn Superoxiddismutase (95, 60) gemessen. Während das Mangan-Enzym durch den Chloroform/Äthanol-Schritt im Trennungsgang nach Tsuchihashi (92) inaktiviert wird, bleibt die Cu/Zn Superoxiddismutase stabil. Daraus erklärt sich die relativ hohe Abnahme der Gesamtaktivität nach diesem Trennungsschritt, die der Angabe der Literatur (95) entspricht. In der Übersicht der einzelnen Reinigungsschritte der Cu/Zn Superoxiddismutase aus normaler und BLV-positiver Rindermilz (siehe Abb.21, S. 96) erkennt man, daß die Proteinbanden der Cu/Zn Superoxiddismutasen sich im Trennungsverlauf bei zunehmender Reinigung des Enzyms verfolgen lassen und den Banden der hier als Markerprotein aufgetragenen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindererythrocyten entsprechen.

Durch die jeweilige Bestimmung des Hämoglobingehalts im Rindermilz-Rohhomogenat wird der Anteil der Cu/Zn Superoxiddismutase aus dem Erythrocytenlysat, das als "Verunreinigung" im Gewebshomogenat mitgeführt wird, kalkulierbar. Ausgehend von der auf Gramm Hämoglobin bezogenen erythrocytären Cu/Zn Superoxiddismutase-Aktivität (2000 U/g Hb) in Humanerythrocyten (36, 46) bei vergleichbaren Enzymaktivitäten im humanen und im bovinen System ergibt sich, daß dieser Anteil im Rohhomogenat der normalen und der BLV-positiven Rindermilz 13 % bzw. 11 % der Gesamtaktivität ausmacht.

Auf eine indirekte Bestimmung des Anteils der mitochondrialen Mn Superoxiddismutase-Aktivität an der in den Rindermilzhomogenaten gemessenen Gesamtaktivität durch Cyanid-Hemmung der Cu/Zn Superoxiddismutase (95) wurde verzichtet, da sowohl bei der Standardisierung des Cytochrom c Reduktionshemmtests (62) als auch des Nitritformationshemmtests (23) eine gereinigte Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindererythrozyten (Diagn. Data Lab.) verwendet wurde (siehe Mat. und Methoden 2.3.3.1. bzw. 2.3.3.2.) und die Kinetik der Reduktionshemmung des Cytochrom c für Mn Superoxiddismutase aus Rindermilzgewebe nicht bekannt ist.

Die Analytik der beiden gereinigten Enzyme aus normaler Rindermilz und BLV-positiver Rindermilz ergibt einige interessante zusätzliche Hinweise auf die Vergleichbarkeit mit den in der Literatur beschriebenen Cu/Zn Superoxiddismutasen aus anderen Geweben. Bereits bei der erstmaligen Präparation der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindermilz (39) wurden drei Aktivitätsbanden nach Polyacrylamid Diskgelelektrophorese beschrieben. Nach der Untersuchung von Zepp et al. (100) kann durch Variation der Ionenstärke im verwandten Tris-Glycin Puffersystem eine Aufspaltung in mehrere Aktivitätsbanden erfolgen und durch die Anzahl der Banden ein Hinweis auf eine teilweise, durch den Trennungsgang bedingte Konformationsänderung gegeben werden. Eine Aufspaltung in mehrere Superoxiddismutase-Aktivitätsbanden wird auch bei geringem präparationsbedingtem Metallverlust - nach Stansell und Deutsch (89) etwa 8 % - beschrieben. Der für beide Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Rindermilz gemessene molare Kupfer- und Zinkgehalt zeigt keinen signifikanten Unterschied zu den Literaturangaben (57, 96), wobei der Metallverlust bei der Präparation aus Milzgewebe den Angaben bei der Isolierung von Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rinderherz (45) und Rinderleber (55) entspricht.

Die bei der isoelektrischen Fokussierung der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindermilzgewebe auftretenden zwei Proteinbanden entsprechen dem Befund der Erstisolierung (39) und liegen bei pH 5,5. Bei hoher Auflösung des pH-Gradienten

(pH 5,0 - 8,0) lagen die Isoenzymbanden der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Hühnerleber (95) im Bereich von pH 6,75 - 5,35, wobei der Nachweis von Isoenzymbanden unterhalb pH 5,0 aufgrund des pH-Bereichs der Ampholingele nicht möglich ist. Die Befunde der isoelektrischen Fokussierung für Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindermilz werden durch die Ergebnisse des Proteinmapping bei ebenfalls hoher Auflösung des pH-Gradienten (4,0 - 6,5 , 1.Dimension) verdeutlicht (siehe Abb. 29, Seite 111). Der isoelektrische Punkt des Enzyms liegt bei pH 5,5. Es darf angenommen werden, daß die bereits erwähnte erythrocytäre Cu/Zn Superoxiddismutase des Rohhomogenats unter den angegebenen Bedingungen der CM-50 Chromatographie bei pH 5,0 (siehe 3.1.8.) zu einem größeren Teil abgetrennt wird. Dies entspricht auch der hohen Superoxiddismutase-Aktivität, die in der nicht bindenden Fraktion der CM-50 Chromatographie (siehe Abb. 16 A und B) bei beiden Isolierungen nachweisbar war, und dem hohen Ausbeuteverlust der Gesamtaktivität in diesem Reinigungsschritt.

Die bestimmten Molekulargewichte für die Untereinheiten der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindermilzgewebe (1 % SDS, 0,1 % ß-Mercaptoäthanol) sind mit den angegebenen Daten der Literatur identisch (96). Die hier beobachtete Tendenz zur Polymerisierung der Untereinheiten zu Tetrameren unter nicht-reduzierenden Bedingungen ist bereits beschrieben (96) und wurde auch für Cu/Zn Superoxiddismutase aus Hühnerleber festgestellt (95). Diese Befunde entsprechen auch dem Verhalten der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Milzgewebe nach Elektrophorese auf einem hyperbolen SDS-Gradientengel (siehe 2.3.5.3.2.), bei der ebenfalls die starke Tendenz zur Polymerisierung der Monomere, die auf eine Aggregationsneigung des Enzyms unter SDS zurückgeführt wird (35), in Erscheinung tritt. Die Eluatfraktionen der G 75 Gelfiltrationschromatographie (siehe 3.1.9.), die in Anwesenheit von 0,1 % ß-Mercaptoäthanol durchgeführt wurde, boten in keinem der beiden Trennungsgänge für Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindermilzgewebe einen Anhalt für ein Polymerisa-

tionsprodukt des Nativproteins, wie es unter nicht-reduzierenden Bedingungen dieses Reinigungsschritts beschrieben ist (95).

Die pulsradiolytisch ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutasen aus normaler und BLV-positiver Rindermilz entsprechen den in der Literatur angegebenen Werten für Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindererythrocyten (51, 81). Obwohl der bei beiden Präparationen vorliegende Kupferverlust für das Enzym aus normaler Rindermilz geringfügig höher lag, konnte in der Pulsradiolyse kein Unterschied der Reaktionskonstanten gemessen werden. Dies entspricht den Befunden von Calabrese et al. (14), die bei teilweisem Kupferverlust in Pulsradiolyse-Messungen von Cu/Zn Superoxiddismutase keine Erniedrigung der Reaktionskonstante feststellten.

Bei den immunologischen Untersuchungen zeigten sich eindeutig strukturelle Unterschiede in den antigenen Determinanten zwischen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindergewebe (sowohl aus normaler wie auch aus BLV-positiver Rindermilz und aus Rindererythrocyten) und aus Human-Erythrocyten, obwohl bei den analytischen Untersuchungen mittels Polyacrylamid Diskgelelektrophorese (siehe Abb. 28, Seite 108) gleichartige Protein- und Aktivitätsbanden (Trennung nach Ladung und Größe) zu erkennen sind. Der Species-Unterschied zwischen Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindergewebe und aus Human-Erythrocyten wird dadurch klar ersichtlich.

Faßt man diese Ergebnisse der Isolierungstechnik und Analytik zusammen, so darf festgestellt werden, daß die isolierten Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Rindermilzgewebe identisch sind und sich für das gereinigte Enzym aus BLV-positiver Rindermilz hinsichtlich Struktur und Funktion kein Anhalt für eine pathologische Veränderung ergibt.
Die enzootische Rinderleukose (Leukosis lymphatica enzootica bovis adulti) ist eine übertragbare, viral bedingte Erkrankung

des lymphatischen Systems und kann in zwei Phasen eingeteilt werden:

(I) Vorstadium (tumorfreie Präleukose)
(II) Tumorös-leukämisches Endstadium

Im tumorösen Stadium, in vielen Fällen auch schon im Vorstadium, sind an der Schnittfläche der Milz die vergrößerten Malpighi'schen Körperchen deutlich von der dunkelbraunroten Pulpa abgehoben. Neben Lymphknoten und Milz sind bevorzugt auch Herz, Pericard, Darmwand und Leber befallen (79). Wenn das tumoröse Stadium erreicht wird, führt die Erkrankung regelmäßig zum Tode. Etwa 40 % der nachweislich infizierten Tiere werden allerdings nie tumorös (79).
Der Erreger (9), das Bovine Leukämievirus (BLV), ein Retrovirus, besteht aus zwei Glykoproteinen (60000 Dalton) und vier nicht glykosierten Proteinen (30000 Dalton). Diese Virusproteine besitzen antigene Eigenschaften, die zur Diagnosestellung nachgewiesen werden.
Die Diagnose erfolgt serologisch über einen Ouchterlony-Immundiffusionstest, bei dem ein hochspezifisches Glykoprotein als Antigen eingesetzt wird. Dieser serologische Antikörpernachweis gilt als beweisend für die Erkrankung; er wird etwa drei Monate post infectionem positiv. Auf diese Weise können erkrankte Tiere bereits im Vorstadium selektioniert werden.
Unter Berücksichtigung des histologischen Befunds der BLV-positiven Rindermilz (siehe 3.1.2. Seite 67) stammt das Ausgangsmaterial von einem Rind in einem präleukotischen Stadium. Im Gegensatz zu dem Ausgangsmaterial für die Isolierung der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Lymhpom-Milz des Menschen, die histologisch einen diffusen Lymphombefall zeigte (39), ist die BLV-positive Rindermilz als nicht tumorös verändert beurteilt worden.
Ob die beschriebenen Veränderungen der Cu/Zn Superoxiddismutase in maligner Lymphom-Milz (39) auch bei der Rinderleukose auftreten, muß bis zu einer Isolierung des Enzyms aus einer Rindermilz in tumorösem Stadium offen bleiben.

4.2. Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten

Noch vor der Aufdeckung seiner enzymatischen Aktivität (62) ist Cu/Zn Superoxiddismutase als kupferhaltiges Metalloprotein aus Human-Erythrocyten (Erythrocuprein) erstmals von Markowitz, Cartwright und Wintrobe 1959 isoliert worden (57). Seit dieser Zeit wurden verschiedene weitere Trennverfahren (3) beschrieben.
Die in dieser Arbeit dargestellte Isolierung erfolgte nach der Methode von Weser (96) und führte bei 953-facher Anreicherung zu einer hochgereinigten Cu/Zn Superoxiddismutase (spezifische Aktivität 3580 U/mg), die nach den in Abschnitt 3.3. aufgeführten Reinheitskriterien den Angaben der Literatur (3, 97) entspricht. Die ermittelte Proteinmenge von 279 ng, die einer Standard-Unit im Aktivitätstest entspricht (62), liegt im Bereich der angegebenen Werte für die isolierten Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Milzgewebe (siehe 4.1.).

Der Versuch, die Cu/Zn Superoxiddismutase aus Humanerythrocyten nach dem gleichen Trennverfahren zu isolieren, das für die Reinigung aus Milzgewebe (39) und Hühnerleber (95) angewandt wurde, ist in Abschnitt 3.2.5. (Seite 94) ausführlich dargestellt. Die nahezu quantitative Wiederfindung der aufgetragenen Superoxiddismutase-Gesamtaktivität im Überstand der Kationenaustauschchromatographie zeigt, daß keine Bindung dieser Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten, für die gegenüber dem Enzym aus Rindergewebe ein deutlich niedrigerer isoelektrischer Punkt in der Literatur angegeben wird (34, 89), nachweisbar war. Das Proteinmuster des Proteinmapping in Abb. 32 (Seite 114) der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten, die ohne den CM-50 Chromatographieschritt gereinigt wurde, ermöglicht unter Kenntnis dieses Bindungsverhaltens folgende Erklärung:

Das Hauptisoenzym der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten zeigt bei hoher Auflösung im Proteinmapping (pH 4,0 - 6,5 , 1. Dimension) im pH-Gradienten einen isoelektrischen Punkt von 4,6. Dieses Isoenzym besitzt nach der Elektrophorese auf einem SDS-Gradientengel (2. Dimension) keine Tendenz zur Polymerisierung von Untereinheiten, auf die bereits in der Diskussion der Befunde bei den isolierten Cu/Zn Superoxiddismutasen aus Rindermilzgewebe eingegangen wurde, sondern bleibt als natives Protein mit einem näherungsweise bestimmten Molekulargewicht von 36000 stabil. Dieses Molekulargewicht liegt im Bereich der angegebenen Molekulargewichte für Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten (3, 34). Unter den Bedingungen der CM-50 Chromatographie wird dieses Isoenzym aufgrund seines isoelektrischen Punkts nicht gebunden. Das bei pH 5,1 dargestellte schwächere Isoenzym der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten entspricht im Gegensatz dazu in seiner Tendenz zur Polymerisierung der Untereinheiten (3) der Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindermilzgewebe, und eine Bindung an CM-50 ist anzunehmen.

Diese Ergebnisse sind für die Reinigung der Cu/Zn Superoxiddismutase aus menschlichem Milzgewebe (39) von großer präparativer Bedeutung, da der Hauptanteil der erythrocytären Cu/Zn Superoxiddismutase durch einen solchen Reinigungsschritt abgetrennt werden kann.

Nach den Ergebnissen der Isolierungstechnik und Analytik, die neben den in 4.1. beschriebenen proteinchemischen Methoden auch immunologische Untersuchungen einschlossen (siehe 3.3.6., 3.3.7.), entsprach die als Referenzenzym gereinigte Cu/Zn Superoxiddismutase aus Human-Erythrocyten in allen bestimmten Parametern den Angaben der Literatur (3, 96).

4.3. Zusammenfassung

Cu/Zn Superoxiddismutase wurde aus normaler Rindermilz und Milz von Rindern mit serologisch nachgewiesenem Antikörper gegen das Bovine Leukämie-Virus(BLV) isoliert. Die spezifische Aktivität des isolierten Enzyms aus normaler und BLV-positiver Rindermilz ist vergleichbar (4020 U/mg bei 744-facher Anreicherung bzw. 3900 U/mg bei 676-facher Anreicherung), ebenso der isoelektrische Punkt des Hauptisoenzyms (jeweils bei pH 5,5).
Die Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten ergab 15000 ± 200 Dalton. Daneben war unter nicht reduzierenden Bedingungen bei SDS-Diskgelelektrophorese eine Tendenz zur Polymerisierung auffallend. Die Metallgehaltsanalyse ergab 1,6 g Atom Kupfer und 1,8 g Atom Zink für das Enzym aus normaler Rindermilz und 1,7 g Atom Kupfer und 1,4 g Atom Zink für die Cu/Zn Superoxiddismutase aus BLV-positiver Rindermilz, wobei die präparativ bedingten Kupfer- und Zinkverluste zu berücksichtigen sind. Die pulsradiolytisch ermittelte Reaktionsgeschwindigkeitskonstante beträgt $1{,}34 \times 10^9$ $M^{-1}sec^{-1}$ bzw. $1{,}39 \times 10^9$ $M^{-1}sec^{-1}$. Unter Berücksichtigung aller proteinchemischen Kriterien sind beide Enzyme identisch und hinsichtlich ihrer Aktivität und den hier angeführten strukturellen Daten mit bekannter Cu/Zn Superoxiddismutase tierischen Ursprungs vergleichbar.

Aus normalen Human-Erythrocyten ließ sich Cu/Zn Superoxiddismutase mit einer spezifischen Aktivität von 3580 U/mg bei 953-facher Anreicherung isolieren. Der isoelektrische Punkt des Hauptisoenzyms liegt bei pH 4,6. Das unter reduzierenden Bedingungen bei SDS-Diskgelelektrophorese ermittelte Molekulargewicht der Untereinheiten beträgt 16500 ± 500 Dalton. Das isolierte Enzym enthält 2,3 g Atom Kupfer und 2,1 g Atom Zink. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante wurde pulsradiolytisch mit $1{,}16 \times 10^9$ $M^{-1}sec^{-1}$ ermittelt. Eine immunologische Reinheitsanalyse wurde mittels Ouchterlony-Immundiffusionstest durchgeführt und läßt eine hochgereinigte Cu/Zn Superoxiddismutase er-

kennen. Bei der zweidimensionalen Polyacrylamid Gelelektrophorese zeigt das Hauptisoenzym aus Human-Erythrocyten mit einem isoelektrischen Punkt von 4,6 pH-Einheiten im Gegensatz zu den Rinderenzymen keine Tendenz zur Polymerisierung von Untereinheiten, während eine sehr schwache Fraktion mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 5,1 diese Polymerisationstendenz aufweist. Das aus Human-Erythrocyten isolierte Enzym entspricht in allen Parametern bekannten Cu/Zn Superoxiddismutasen aus gesundem menschlichem Gewebe.

Der Species-Unterschied der gereinigten Cu/Zn Superoxiddismutase aus Rindergewebe gegenüber dem isolierten Enzym aus Human-Erythrocyten konnte in den immunologischen Untersuchungen klar gezeigt werden.

5. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. BABIOR, B.M., CURNUTTE, J.T., MC MURRICH, B.J.: The particulate superoxide-forming system from human neutrophils: properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst.
J. Cli. Invest. 58, 989 (1976)

2. BANNISTER, J., BANNISTER, W., WOOD, E.: Bovine erythrocyte cupro-zinc protein.
Eur. J. Biochem. 18, 178 (1971)

3. BANNISTER, W.H., ANASTASI, A., BANNISTER, J.V.: Human erythrocyte superoxide dismutase (erythrocuprein).
In: "Superoxide and superoxide dismutase" (Michelson, A.M., Mc Cord, J.M., Fridovich, I., eds),
Academic Press, London, 1977, S. 107

4. BARRA, D., MARTINI, F., BANNISTER, J.V., SCHININA, N.E., ROTILIO, G., BANNISTER, W.H., BOSSA, F.: The complete amino acid sequence of human Cu/Zn superoxide dismutase.
FEBS Letters 120/1, 53 (1980)

5. BARTKOWIAK, A., BARTKOWIAK, J.: Superoxide dismutase and catalase activities in normal and cancerous tissues.
Comp. Biochem. Physiol. 70B, 819 (1981)

6. BARTOLI, G.M., BARTOLI, S., GALEOTTI, T., BERTOLI, E.: Superoxide dismutase content and microsomal lipid composition of tumours with different growth rates.
Biochim. Biophys. Acta 620, 205 (1980)

7. BEAUCHAMP, CH., FRIDOVICH, I.: Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels.
Anal. Biochem. 44, 276 (1971)

8. BENON, H., BIELSKI, J., GEBICKI, J.M.: Application of radiation chemistry to biology. In: "Free radicals in biology" (Pryor, W., ed.),
Academic Press, New York, 1977, Vol. 3, S. 1

9. BEX, F., BRUCK, C., MAMMERICKX, M., PORTETELLE, D., GHYSDAEL, J., CLEUTER, Y., LECLERCQ, M., DEKEGEL, D., BURNY, A.: Humoral antibody response to bovine leukemia virus infection in cattle and sheep.
Cancer Res. 39, 1118 (1979)

10. BIZE, I.B., OBERLEY, L.W., MORRIS, H.P.: Superoxide dismutase and superoxide radical in Morris hepatomas.
Cancer Res. 40, 3686 (1980)

11. BOVERIS, A.: Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. In: "Oxygen and physiological function" (Jöbsis, F.F. ed.),
Professional Information Library, 1977, S. 67

12. BROWNING, D.R.: Spectroscopy.
Mc Graw-Hill, London (1969)

13. BURRI, B.J., CHAN, S.G., BERRY, A.J., YARNELL, S.K.: Blood levels of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in duchenne muscular dystrophy.
Clin. Chim. Acta 105, 249 (1980)

14. CALABRESE, L., COCCO, D., RIGO, A., ROTILIO, G.: Preparation and preliminary characterization of bovine Cu, Zn superoxide dismutase with selectively metal-free or metal-substituted subunits. In: "Chemical and Biochemical aspects of superoxide and superoxide dismutase" (Bannister, J.V., Hill, H.A.O., eds),
Elsevier North Holland, Inc., 1980 S.265

15. CARRICO, R.J., DEUTSCH, H.F.: Isolation of human hepatocuprein and cerebrocuprein.
J. Biol. Chem. 244, 6087 (1969)

16. CROUCH, R.K., GANDY, S.E., KIMSEY, G., GALBRAITH, R.A., GALBRAITH, G.M.P., BUSE, M.G.: The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs.
Diabetes 30, 235 (1981)

17. CURNUTTE, J.T., WHITTEN, D.M., BABIOR, B.M.: Defective superoxide production by granulocytes from patients with chronic granulomatous disease.
New Engl. J. Medic. 290, 593 (1974)

18. DAVIES; B.J.: Disc elektrophoresis II. Method and application to human serum proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964)

19. DE CHATELET, L.R., MC CALL, CH.E., MC PHAIL, L.C.,JOHNSTON, R.B.: Superoxide dismutase activities in leukocytes.
The J. of Clin. Invest. 53, 1197 (1974)

20. DEWALD, B., BAGGIOLINI M., CURNUTTE, J.T., BABIOR, B.M.: Subcellular localization of the superoxide-forming system in human neutrophils.
J. Clin. Invest. 63, 21 (1979)

21. DORFMAN, L.M., ADAMS, G.E.: Reactivity of the hydroxyl radical in aqueous solutions.
NSRDS-NBS No 46, US Department of Commerce, National Bureau of Standards, Bethseda (1979)

22. ELSTNER, E.F., Botanisches Institut der Technischen Universität München.
Persönliche Mittteilung

23. ELSTNER, E.F., HEUPEL, A.: Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase.
Anal. Biochem. 70, 616 (1976)

24. FEE, J.A., GABER, B.P.: Anion binding to bovine erythrocyte superoxide dismutase.
J. Biol. Chem. 247, 60 (1972)

25. FIELDEN, E.M., ROBERTS, P.B., BRAY, R.C., LOWE, D.J., MAUTNER, G.N., ROTILIO, G., CALABRESE, L.: The mechanism of action of superoxide dismutase from pulse radiolysis and electron paramagnetic resonance.
Biochem. J. 139, 49 (1974)

26. FONG, K.L., MC CAY, P.B., POYER, J.L., KEELE, B.B., MISRA, H.: Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity.
J. Biol. Chem. 248, 7792 (1973)

27. FRIDOVICH, I.: Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. In: "Free radicals in biology" (Pryor, W., ed.),
Academic Press, New York, 1976, S. 239

28. FRIDOVICH, I.: Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by xanthine oxidase.
J. Biol. Chem. 245, 4053 (1970)

29. FRIDOVICH, I.: The biology of oxygen radicals.
Science 201, 733 (1978)

30. GERLI, G.C., BERETTA, L., BIANCHI, M., PELLEGATTA, A., AGOSTINI, A.: Erythrocyte superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in beta-thalassämia (major and minor).
Scand. J. Haematol. 25, 87 (1980)

31. GILBERT, D.L.: Speculation on the relationsip between organic and atmospheric evolution.
Perspectives Biol. Med. 4, 58 (1960)

32. HALLIWELL, B.: Generation of hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radicals during the oxidation of bihydroxyfumaric acid by peroxidase.
Biochem. J., 163, 444 (1977)

33. HALLIWELL, B.: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates.
FEBS Letters 92, 321 (1978)

34. HARTZ, J.W., DEUTSCH, H.F.: Preparation and physicochemical properties of human erythrocuprein.
J.Biol. Chem. 244, 4565 (1969)

35. HARTZ, J.W., DEUTSCH, H.F.: Subunit structure of human superoxide dismutase.
J. Biol. Chem. 247, 7043 (1972)

36. HARTZ, J.W., FUNAKOSHI, S., DEUTSCH, H.F.: The levels of superoxide dismutase and catalase in human tissue as determined immunochemically.
Clin. Chim. Acta 46,125 (1973)

37. HATCHIKIAN, C.E., LEGALL, J., BELL, G.R.: Significance of superoxide dismutase and catalase activities in the strict anaerobes, sulfate reducing bacteria. In: "Superoxide and superoxide dismutases" (Michelson., A.M., McCord, J.M., Fridovich, I., eds),
Academic Press, London, 1977, S. 159

38. HIJMANS, W., SCHUTT, H.R.E., KLEIN, F.: An immunofluorescence procedure for the detection of intracellular immunoglobulins.
Clin. exp. Immunol. 4, 457 (1969)

39. ISSELS, R.D.: Superoxiddismutase in lymphatischen Zellen. Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie, 1980

40. ISSELS, R.D., SCHALHORN, A., THIEL, E.: Superoxide dismutase activity in T and B lymphoma and its possible relationship to radiation sensivity. In: "Oxygen and oxy-radicals in chemistry and biology",
Academic Press, London, 1981, S. 667

41. ISSELS, R.D., WILMANNS, W., WESER, U.: Superoxide dismutase activity in human malignant lymphoma. In: "Biological and clinical aspects of superoxide and superoxide dismutase" (Bannister, W.H., Bannister, J.V., eds.),
Elsevier North Holland, Inc., 1980, S. 281

42. JOENJE, H., ERIKSSON, A.W., FRANTS, R.R., ARWERT, F., HOUWEN, B.: Erythrocyte superoxide dismutase deficiency in fanconi's anaemia.
The Lancet, Jan. 28, 204 (1978)

43. JOHNSTON, R.B.Jr., KEELE, B.B.Jr., MISRA, H.P., LEHMEYER, J.E., WEBB, L.S., BAEHNER, R.L., RAJAGOPALAN, K.V.: The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity. Studies with normal and chronic granulomatous disease leukocytes.
J. Clin. Invest. 55, 1357 (1975)

44. JOHNSTON, R.B. Jr., LEHMEYER, J.E.: The involvement of oxygen metabolites from phagocytic cells in bactericidal activity and inflammation. In: "Superoxide and superoxide dismutases" (Michelson, A.M., Mc Cord, J.M., Fridovich, I. eds),
Academic Press, London, 1977, S. 291

45. KEELE, B.B., MCCORD, J.M., FRIDOVICH, I.: Further characterization of bovine superoxide dismutase and its isolation from bovine heart.
J. Biol. Chem. 246, 2875 (1971)

46. KOBAYASHI, Y., ISHIGAME, K., ISHIGAME, Y., USUI, T.: Superoxide dismutase activity of human blood cells. In: "Biochemical and medical aspects of active oxygen (Hayaishi, O.H., Asada, K. eds.),
University Park Press, Baltimore, London, 1977, S. 247

47. KOBAYASHI, Y., OKAHATA, S., SAKANO, T., TANABE, K., USUI, T.: Superoxide dismutase activity of T lymphocytes and non-T lymphocytes.
FEBS letters, 98/2, 391 (1979)

48. KOBAYASHI, Y., OKAHATA, S., TANABE, K., USUI, T.: Evaluation of nitrite formation inhibition method in the determination of superoxide dismutase activity of human blood cells.
Hiroshima J. Med. Sci. 27, 203 (1978)

49. KOBAYASHI, Y., OKAHATA, S., TANABE, K., USUI, T.: Use of logit paper in determination of superoxide dismutase activity in human blood cells.
J. Immunol. Meth. 24, 75 (1978)

50. LAVELLE, F., MICHELSON, A.M., DIMITREJEVIC, L.: Biological protection by superoxide dismutase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 55, 350 (1973)

51. LENGFELDER, E.: Strahleninduzierte und biochemische Bildung von Sauerstoffradikalen: Nachweis Reaktivität, pathophysiologische und regulatorische Aspekte.
Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität München (1979)

52. LESKO, S.A., LORENTZEN, R.J., TS'O, P.O.P.: Role of superoxide in deoxyribonucleic acid strand scission.
Biochemistry 19, 3023 (1980)

53. LKB: Instruction. LKB ampholine PAG plates for analytical electrofocusing on polyacrylamide gels.
LKB-Produkter AB, Bromma, Schweden

54. LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

55. MANN, T., KEILIN, D.: Haemocuprein and hepatocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals.
Proc. Roy. Soc. London Ser. B, 126, 303 (1939)

56. MARKLUND, S.L., WESTMAN, N.G., LUNDGREN, E., ROOS, G.: Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues.
Cancer Res. 42, 1955 (1982)

57. MARKOWITZ, H., CARTWRIGHT, G.E., WINTROBE, M.M.: Studies on copper metabolism.
XXVII. The isolation and properties of an erythrocyte cuproprotein (erythrocuprein).
J. Biol. Chem. 234, 40 (1959)

58. MAURER, H.J. (ed.): "Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis".
W. de Gruyter, Berlin, New York (1971)

59. MC CORD, J.M.: Free radicals and inflammation protection of synovial fluid by superoxide dismutase.
Science 185, 529 (1974)

60. MC CORD, J.M., BOYLE, J.A., DAY, E.D., RIZZOLO, L.J., SALIN, M.L.: A manganese-containing superoxide dismutase from human liver. In: "Superoxide and superoxide dismutases" (Michelson, A.M., Mc Cord, J.M., Fridovich, I., eds.),
Academic Press London, 1977, S. 129

61. MC CORD, J.M., DAY, E.D.JR.: Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex.
FEBS Lett. 86, 139 (1978)

62. MC CORD, J.M., FRIDOVICH, I.: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein.
J. Biol. Chem. 244, 6049 (1969)

63. MC CORD, J.M., FRIDOVICH, I.: The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase.
J. Biol. Chem. 243, 5753 (1968)

64. MC CORD, J.M., WONG, K.: Phagocyte-produced free radicals: Roles in cytotoxicity and inflammation. In: "Oxygen free radicals and tissue damage" (Ciba Found. Symp. 65),
Elsevier, Excerpta Medica North Holland, Amsterdam, 1979, S. 343

65. MENNELLA, M.R.F., JONES, R.: Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid-peroxidation reactions in semen.
Biochem. J. 191, 289 (1980)

66. MISRA, H.P., FRIDOVICH, I.: The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones.
J. Biol. Chem. 247, 188 (1972)

67. MORGAN, A.R., CONE, R.L., ELGERT, T.M.: The mechanism of DNA strand breakage by vitamin C and superoxide and the protective roles of catalase and superoxide dismutase.
Nucleic Acids, Res., 3, 1139 (1976)

68. OBERLEY, L.W., BUETTNER, G.R.: Role of superoxide dismutase in cancer: a review.
Cancer Res. 39, 1141 (1979)

69. O'FARRELL, P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.
J. Biol. Chem. 250, 4007 (1975)

70. OKAHATA, S., NISHI, Y., HATANO, S., KOBAYASHI, Y., USUI, T.: Changes in erythrocyte superoxide dismutase in a patient with copper deficiency.
Eur. J. Pediatr. 134, 121 (1980)

71. ORNSTEIN, L.: Disc electrophoresis - I. Background and theory.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321 (1964)

72. PESKIN, A., KOEN, Ya. M., ZBARSKY, I.B., KONSTANTINOV, A.A.: Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in tumors.
FEBS Letters 78, 41 (1977)

73. PETKAU, A., CHELACH, W.S., PLESKACH, S.D., MEEKER, B.E., BRADY, C.M.: Radioprotection of mice by superoxide dismutase.
Biophys. Res. Comm. 65, 886 (1975)

74. PUGET, K., MICHELSON, A.M.: Isolation of a new copper-containing superoxide dismutase. Bacteriocuprein.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 58, 830 (1974)

75. RISTER, M., BAUERMEISTER, K., GRAVERT, U., GLADTKE, E.: Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in polymorphonuclear leukocytes.
Eur. J. Pediatr. 130, 127 (1979)

76. RISTER, M., BAUERMEISTER, K., GRAVERT, U., GLADTKE, E.: Superoxide dismutase deficiency in Rheumatoid Arthritis.
The Lancet, May 20, 1094 (1978)

77. ROOT, R.K., METCALF, J.A.: H_2O_2 release from human granulocytes during phagocytosis. Relationship to superoxide anion formation and cellular catabolism of H_2O_2: Studies with normal and cytochalasin B-treated cells.
J. Clin. Invest. 60, 1266 (1977)

78. ROSEN, H., KLEBANOFF, S.J.: Bactericidal activity of a superoxide anion-generating system. A model for the polymorphonuclear leukocyte.
J. Exp. Med. 149, 27 (1979)

79. ROSENBERGER, G.: Lymphatische Leukose erwachsener Rinder. In: "Krankheiten des Rindes" (Rosenberger, G., Dirksen, G., Gründer, H.D., Stöber, M., eds.),
Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg (1978) S. 54

80. ROTILIO, G., BOZZI, A., MAVELLI, I., MONDOVI; B., STROM, R.: Tumor cells as models for oxygen-dependent cytotoxicity. In: "Biological and clinical aspects of superoxide and superoxide dismutase." (Bannister, W.H., Bannister, J.V., eds.),
Elsevier North Holland, Inc., 1980, S. 118

81. ROTILIO, G., BRAY, R.C., FIELDEN, E.M.: A pulse radiolysis study of superoxide dismutase.
Biochem. Biophys. Acta 268, 605 (1972)

82. SALIN, M.L., BRIDGES, S.M.: Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, brassica campestris.
Arch. Biochem. Biophys. 201, 369 (1980)

83. SALIN, M.L., MC CORD, J.M.: Free radicals in leukocyte metabolism and inflammation. In: "Superoxide and superoxide dismutases" (Michelson, A.M., Mc Cord, J.M., Fridovich, I., eds.),
Academic Press, New York, 1977, S. 257

84. SALIN, M.L., MC CORD, J.M.: Superoxide dismutase in polymorphonuclear leukozytes.
J. Clin. Invest. 54, 1005 (1974)

85. SALIN, M.L., WILSON, W.W.: Porcine superoxide dismutase.
Mol. and Cell. Biochem. 36, 157 (1981)

86. SBARRA, A.J., KARNOVSKY, M.L.: The biochemical basis of phagocytosis. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes.
J. Biol. Chem. 234, 1355 (1959)

87. SCHOPF, J.W.: The evolution of the earliest cells.
Sci. Am. 239, 111 (1978)

88. SINET, P.M., LAVELLE, F., MICHELSON, A.M., JEROME, H.: Superoxide dismutase activities of blood platelets in Trisomy 21.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 904 (1975)

89. STANSELL, M.J., DEUTSCH, H.F.: Physicochemical studies of crystalline human erythrocuprein.
J. Biol. Chem. 240, 4306 (1965)

90. STEGEMANN, H.: SDS-gel-electrotrophoresis in polyacrylamide, merits and limits. In: "Electrokinetic separation methods" (Righetti, P.G., van Oss, C.D., Vanderhoff, J.W., eds.),
Elsevier North Holland Biomedical Press, 1979, S. 313

91. TOTTER, J.R.: Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1763 (1980)

92. TSUCHIHASHI, M.: Zur Kenntnis der Blutkatalase.
Biochem. Z. 140, 63 (1923)

93. VAN KAMPEN, E.J., ZIJLSTRA, W.G.: Standardization of hemoglobinometry. II. The hemoglobincyanide method.
Clin. Chim. Acta 6, 538 (1961)

94. WEBER, K., OSBORN, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)

95. WEISIGER, R.A., FRIDOVICH, I.: Superoxide dismutase. Organelle specificity.
J. Biol. Chem. 248, 3582 (1973)

96. WESER, U.: Structural aspects and biochemical function of erythrocuprein.
Structure and Bonding 17, 1 (1973)

97. WESER, U., BUNNENBERG, E., DAMMACK, R., DJERASSI, C., FLOHÉ, L., THOMAS, G., VOELTER, W.: A study on purified bovine erythrocuprein.
Biochim. Biophys. Acta, 243, 203 (1971)

98. WESTMAN, N.G., MARKLUND, S.L.: Copper- and zinc-containing superoxide dismutase and manganese-containing superoxide dismutase in human tissues and human malignant tumors.
Cancer Res. 41, 2962 (1981)

99. YAMANAKA, N., OTA, K., UTSUMI, K.: Changes in superoxide dismutase activities during development, aging, and transformation. In: "Biochemical and medical aspects of active oxygen" (Hayaishi, O., Asada, K., eds.),
University Park Press, Baltimore, 1978, S. 183

100. ZEPP, R.A., CHELACK, W.S., PETKAU, A.: Bovine superoxide dismutase preparations: comparison of their biochemical and biological characteristics. In: "Chemical and biochemical aspects of superoxide and superoxide dismutase" (Bannister, J.V., Hill, H.A.O., eds.),
Elsevier North Holland, Inc., 1980 S.201

Herrn Prof. Dr. W. Wilmanns bin ich für die Überlassung der Arbeit und die Möglichkeit, die Laboreinrichtungen seiner Klinik zu benutzen, zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. med. Dipl. biochem. Rolf Dieter Issels danke ich für seine Betreuung, seine Anregungen und seine konstruktive Kritik bei der Einarbeitung in die Thematik und bei dem Erlernen zahlreicher Arbeitsmethoden.

Besonderen Dank schulde ich meinem Kommilitonen und Freund, Herrn cand. med. Siegfried Prenninger, welcher als Doktorand mit mir gemeinsam viele Stunden im Labor verbracht hat und mir außergewöhnliche Kameradschaft entgegengebracht hat.

Herrn Dr. med. E. Lengfelder, Strahlenbiologisches Institut der Universität München, bin ich für die Durchführung der pulsradiolytischen Messungen und manchen guten Rat dankbar.

Herr Prof. Dr. Elstner und Herr Dr. Youngman, Botanisches Institut der Technischen Universität München, konnten mir bei vielen Schwierigkeiten, die im Laufe der Zeit auftraten, wertvolle Hinweise geben, wofür ich ihnen großen Dank schulde.

Herrn Prof. Dr. med. Lamerz, Medizinische Klinik II des Klinikums Großhadern, sei sehr herzlich für seine überaus hilfreiche Unterstützung bei immunologischen Untersuchungen gedankt.

Ebenso habe ich Herrn Dr. med. Sauer, Herrn Dr. med. Schalhorn, Herrn Dr. med. Siegert und Herrn Dr. med. Wagner von der Medizi-

nischen Klinik III des Klinikums Großhadern zu danken, deren Laboreinrichtung ich teilweise mitbenutzen konnte, und die mir manch guten Rat erteilt haben.

Großen Dank schulde ich auch Herrn cand. med. Robert Zimmermann, der mich mit großem Engagement und Können in die Technik der Polyacrylamid Gelelektrophorese auf Plattengelen eingeführt hat.

Herrn Dr. med. vet. Schneidawind von der Sanitätsabteilung sowie der Tierärztlichen Abteilung des Münchener Schlachthofes bin ich für die Überlassung der Rindermilzen sowie viele Auskünfte über veterinärmedizinische Fragen dankbar.

Herr Prof. Dr. vet. G. Dirksen, Innere Tierklinik der Universität München, hat mir bereitwillig viele Fragen bezüglich der enzootischen Rinderleukose beantwortet, wofür ich ihm danken möchte.

Ebenso sei nochmals an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. U. Loehrs, Pathologisches Institut der Universität München, herzlichst gedankt, der mir freundlicherweise etliche Schnitte von Rindermilzen angefertigt und begutachtet hat.

Herrn Prof. Dr. med. Drexel, Balneologische Abteilung des Klinikums Großhadern, danke ich herzlichst für die Erlaubnis, an dem Atomabsorptionsspektrophotometer seiner Klinik Messungen durchführen zu dürfen.

Schließlich und endlich möchte ich auch Frau Marias, die mir in unermüdlichem, liebenswürdigem Einsatz die Labor-Glasmaterialien gespült hat und mir dadurch sehr viel Zeit gespart hat, zutiefst danken.

Lebenslauf

16.12.1957	Geboren in Bayreuth/Ofr. als Sohn des Pfarrers Gerhard Groeneveld und seiner Ehefrau Dr. Gisela, geborene Schäfer.
1964/65	Besuch der Grundschule in Hutschdorf/Ofr.
1965 - 1968	Besuch der Grundschule in Kahl am Main/Ufr.
1968 - 1977	Besuch des Humanistischen Spessart-Gymnasiums Alzenau /Ufr., Abitur 1977
seit 1.11.1977	Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität zu München; ärztliche Vorprüfung 1979, erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung 1980, zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung 1983.